

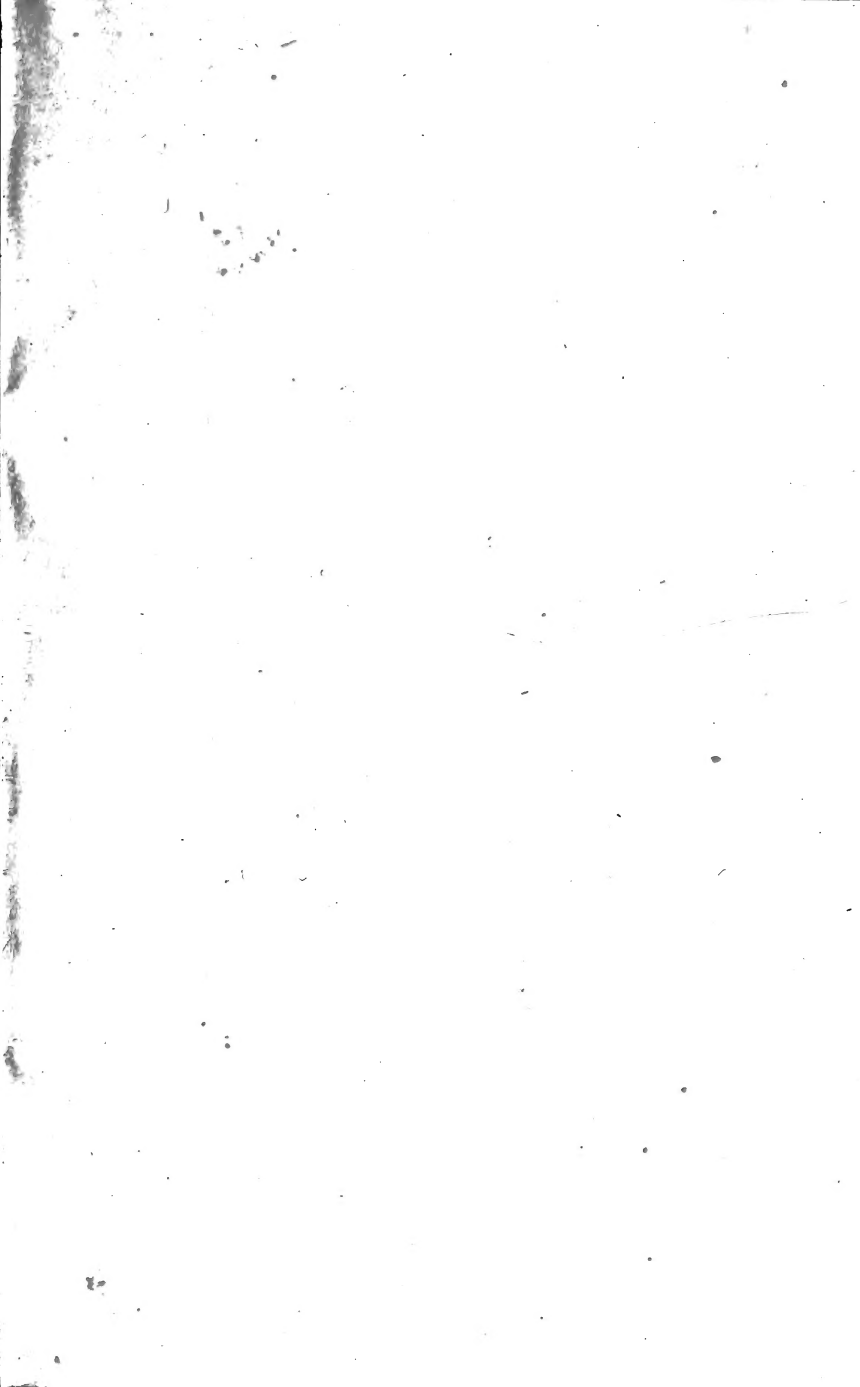
生物工程原理

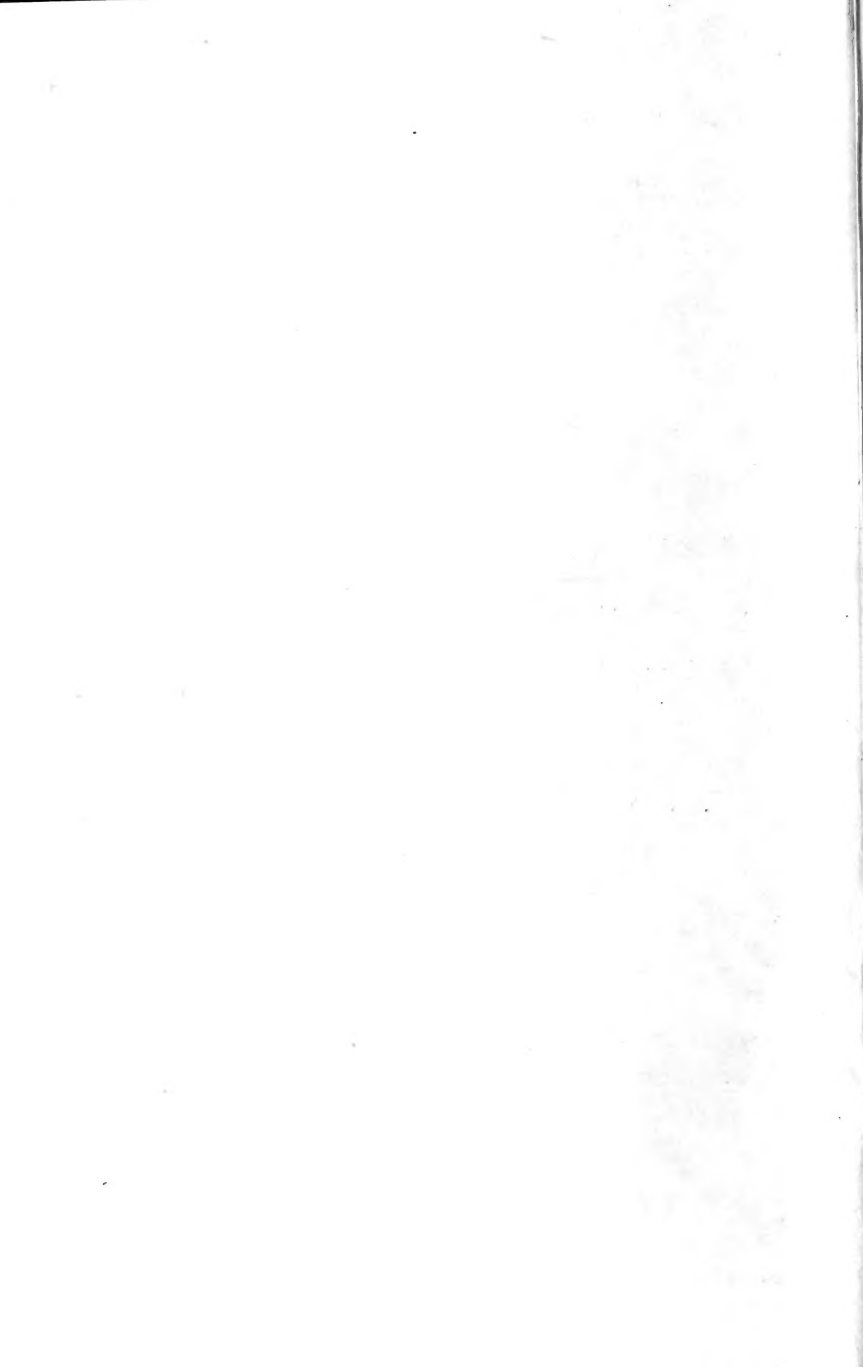
J·E·史密斯著

卢长明 译

世界图书出版公司







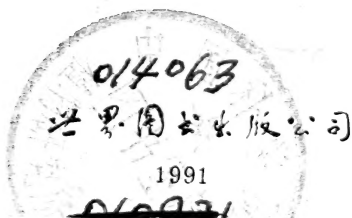
58.17
883

生物工程原理

〔英〕J.E.史密斯 著

卢长明 译

严绍颐 校



中科院植物所图书馆



S0013764

内 容 简 介

本书系统介绍了生物工程的基本概念、基本技术和原理及其最新进展。全书共分五章，分别介绍了基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程和生化工程的基本内容。对渴望系统了解生物工程的广大读者及从业者均有较大参考价值。本书可供从事医药、食品、农业、发酵工业、环境保护和石油开采等领域的技术人员参考。

J.E.Smith

Aspects of Microbiology 11

BIOTECHNOLOGY PRINCIPLES

Van Nostrand Reinhold (UK) Co.Ltd, 1985

生物工程原理

[英] J.E.史密斯 著

卢长明 译

严绍颐 校

责任编辑 西世良

世界图书出版公司 出版

北京朝阳门内大街137号

三环印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1991年12月第一版 开本：787×1092 1/32

1991年12月第一次印刷 印张：6

印数：0001—2000 字数：12千字

ISBN: 7-5062-1149-1/Q·4

定 价：6.40元

中译本序言

生物工程是世界新技术革命的三大支柱之一。生物工程的发展，特别是基因重组技术的成功使人类进入了按自己的需要创建新生物的伟大时代。今后10—20年的时间里，正是建立和发展这一新产业的重要时期。

生物工程直接关系到农林牧渔、医药卫生、轻工食品、能源化工、环境保护等重要领域的革新改造和新兴产业的形成，既是现实的生产力，也是更大的潜在生产力。开发生物工程技术无论对于发达国家还是发展中国家都具有十分重要的战略意义。

目前，生物工程与其它先进技术，如微电子技术、光纤通信等相比，在大规模生产应用方面还处于幼年阶段，世界各国都还起步不久，差距还不甚大，如能抓住良机，有计划，有步骤地及早培训出一批技术骨干，为他们创造较好的工作条件，在一些领域内取得重点突破是完全可能的。

生物工程是一个知识和技术密集性很强的领域，涉及的学科和行业极广，充分开发生物工程的潜力有待多学科多行业的人协作攻关，共同努力。不同学科的专家缺乏生物工程方面的共同语言将会严重阻碍这一新技术潜力的发挥。英国著名生物工程学家约翰·史密斯教授的新著《生物工程原理》一书，从应用遗传学、发酵工程、酶和固定化细胞技术以及发酵产物加工等几个方面阐述了生物工程的发生发展所依据的基本原理，简明扼要，内容翔实，可读性强，是沟通不同学科共同语言的良好教材，也是渴望了解生物工程的初学者的

入门参考书。相信它的出版对于我国生物工程事业的发展将起到有益的推动作用。

江西省科学委员会主任

杨淳朴

1990.4.19

译 者 的 话

《生物工程原理》一书是英国著名生物工程学家约翰·史密斯 (John Smith) 教授继《生物工程》一书之后出版的又一有关生物工程的论著。他的著述被当今生物工程界誉为“权威性的”。本书援引了大量80年代新成果，用五章的篇幅较系统地介绍了生物工程的基本概念、基本原理和技术，对于渴望全面了解生物工程的广大读者不失为一本既简明扼要又内容丰富的参考教材。

1985年我在意大利圣心大学学习时，适逢约翰·史密斯教授的新著《生物工程原理》一书出版。当时，我的老师罗伦佐尼 (C. Lorenzoni) 教授将它作为主要阅读参考书之一推荐给我，阅后深感受益匪浅。今天，正值生物工程浪潮在我国蓬勃兴起之际，我不揣才疏学浅，冒昧译出此书，以飨我国读者。由于水平有限，译文中谬误之处在所难免，敬请读者批评指正。

本书在出版过程中，得到了江西省科学委员会的大力支持。杨淳朴、欧阳谅、罗明、秦孝远、黎开金等专家教授为本书的出版做了大量工作。严绍颐研究员审校了全部书稿。薛丽同志协助整理了译稿。没有他们的支持，本书难以与读者见面，译者在此一并表示衷心的感谢。

译者 卢长明

一九九零年四月二十六日

于江西农业大学

前 言

生物工程涉及应用生物科学与工程学，它包括对生物有机体及其亚细胞组分在制造业和服务性工业以及在环境管理等方面的实际应用。生物工程的应用只有通过多学科、多技术的结合才能成功，其中包括生物化学、微生物学、遗传学、分子生物学和化学加工工程等。这本小册子旨在阐述生物工程发展所依据的基本原理，并希望生物工程各个主要分支领域的学生和从业者们能从中获得对生物工程全貌的了解。

约翰·史密斯

目 录

第一章 绪论

- 1.1 生物工程的性质..... (1)
- 1.2 生物工程的历史沿革..... (3)
- 1.3 生物工程的应用..... (9)
- 1.4 生物工程的发展..... (11)
- 1.5 生物工程的战略规划..... (12)

第二章 应用遗传学

- 2.1 选育和筛选..... (15)
- 2.2 菌种的保藏..... (18)
- 2.3 诱变育种..... (19)
- 2.4 有性杂交..... (21)
- 2.5 准性过程..... (23)
- 2.6 重组DNA技术..... (33)
- 2.7 重组DNA试验的准则与控制..... (48)

第三章 发酵工程

- 3.1 发酵工程的性质..... (53)
- 3.2 液态系统中微生物培养的原理..... (58)
- 3.3 生物反应器的设计..... (64)
- 3.4 培养基的设计..... (71)
- 3.5 生物反应器的仪表与过程控制..... (74)
- 3.6 检测技术..... (76)
- 3.7 质量与能量的传递..... (78)

3.8	放大	(82)
3.9	动物细胞的培养	(85)
3.10	植物细胞的培养	(92)
3.11	固相底物发酵	(95)
第四章 酶与固定化细胞工程		
4.1	提取酶的商业应用	(105)
4.2	酶的来源	(106)
4.3	酶的生产	(108)
4.4	酶的立法	(114)
4.5	固定化酶	(116)
4.6	固定化酶的性质	(124)
4.7	细胞的固定化	(127)
第五章 出料加工		
5.1	发酵液处理原则	(136)
5.2	发酵液处理技术	(140)
5.3	固相与液相的分离	(142)
5.4	固相内产物	(146)
5.5	从澄清液相中分离产物	(147)
5.6	产品的稳定性	(154)
5.7	利用重组DNA技术的前景	(155)
附录一 名词解释		(158)
附录二 名词索引		(161)
参考文献		(169)

第一章 绪 论

1.1 生物工程的性质

生物工程是涉及应用生物科学和工程学的一个领域，它包括生物体或其亚细胞组分在制造业、服务业和环境管理等方面的实际应用。生物工程以细菌、酵母、真菌、藻类、植物细胞和培养的哺乳动物细胞作为工业生产过程的来料。只有微生物学、生物学、遗传学、分子生物学、化学和化学工程诸学科、多技术的结合才能使生物工程的应用获得成功。

生物工艺过程通常包括生物细胞或生物材料的生产以及所需化学转化物的获得。后者又可分为：

(1) 所需终产物的合成（例如酶、抗生素、有机酸、类固醇）；

(2) 特定起始物的分解（例如污水处理、工业废物及废油的分解）。

生物工艺过程的反应有的是分解反应——由复杂的化合物分解为简单的化合物（例如由葡萄糖产生乙醇）；有的是合成代谢，或称生物合成——由简单的分子合成较复杂的分子（例如抗生素的合成）。分解代谢的反应通常是放能反应，而合成代谢的反应通常是吸能反应。

生物工程涉及发酵工程（如啤酒、葡萄酒以及面包、乳酪、抗生素和疫苗）、水和废物处理、部分食品工程，以及

从生物医学到低纯度矿石中的金属回收等众多领域，其应用范围越来越广泛。生物工程将在许多工业生产过程中，产生重大的影响。从理论上讲，几乎所有有机物都可以用生物工程的方法产生。据估计，到2000年，世界范围内生物工程产品的市场潜力将可达到65万亿美元（表1）。但是，也要看到许多新的重要生物产品（如含有干扰素成分的一些新药）仍然要根据现有的各种生物学分子的模式进行化学合成。因此，对于生物科学与化学的交叉领域以及它们与生物工程的关系都必须作广泛的深入了解。

表1 2000年世界生物工程市场的发展潜力预测值

市场类别	美元（百万）
能 量	16350
食 品	12655
化学品	10550
医 药	9080
农 业	8546
金属回收	4570
污染控制	100
其它（预计外开发）	3000
总 计	64851

与现行的传统工业过程相比，生物工程中使用技术大部分趋向于比较省钱、耗能少和安全可靠，并且大多数工艺过程所留下的废物可进行生物降解并且无毒。从长远来看，生物工程将为解决世界上的一些主要难题提供手段，对于医药、食品生产、污染控制和新能源的开发尤其如此。

1.2 生物工程的历史沿革

一般认为，生物工程是件新鲜事物，其实它的历史已经很久。实际上，它经历了四个主要的发展阶段才形成了现代生物工程体系。

1.2.1 食品和饮料的生物工艺阶段 我们知道，烤面包、酿酒和制葡萄酒等活动在几千年前就开始了。早在公元前6000年，古代萨马人和巴比伦人已经知道喝啤酒；埃及人早在公元前4000年已经会烤制发酵的面包；早在《创世纪》一书问世的时候，葡萄酒早已闻名于近东。到十七世纪，安顿·凡·列文霍克认识到是一些叫做酵母菌的生物与这些过程有关。1857—1876年间，巴斯德进行了开创性的工作，并确证了这些微生物的发酵能力。巴斯德是当之无愧的生物工程之父。

其它以微生物为基础的生产过程，如发酵乳制品的生产（包括乳酪、酸奶等）和各种东方食品的生产（如酱油、印尼豆酵饼等）都同样有着很古老的渊源。蘑菇的人工栽培是较近的事。日本香菇的栽培可追溯到几百年前，现在世界温带地区广泛种植的伞菇大约有300年的历史。

这些微生物生产过程的兴起是源于偶然的发现还是直观的试验还不能肯定，但它们连续不断的发展无疑为证明人类已经能够利用生物的生命活动来满足自己的需要提供了早期的例证。近年来，这些生产过程更有赖于先进的科学技术，它们对世界经济的贡献也与日俱增，与其初期阶段相比，现在的贡献不知大了多少倍。

1.2.2 最初在不灭菌的条件下发展起来的生物工艺过程

到十九世纪末,工业上许多重要的化合物(如乙醇、醋酸、有机酸、丁醇和丙酮)开始用微生物发酵的方法生产,这时使用的方法是向环境开放的,对微生物污染的防止是通过细心控制生态环境的方式进行的,而未使用复杂的工程措施。然而,随着石油时代的到来,由于用石油加工的副产品生产这些化合物更便宜,许多上述刚出现的工业相形之下曾一度失去了光泽。近年来,由于石油价格逐步上涨,人们不得不回过头来从商品生产的角度重新评价早期的发酵方法。这些发酵方法,包括前面提到的那些食品发酵在内,它们的操作均比较简单,而且可以大规模生产。

无灭菌过程的生物工程的突出实例是废水处理和城市固体废物的堆肥。很久以来,微生物已被用于人类污水的分解和解毒,其次是用于有毒工业废物(如化学工业废物)的处理。用生物工程方法进行废水处理是迄今在全世界实施的具有最大发酵能力的工程(然而,很少人认识到这一点)(见表2)。

表2 英国发酵工业的总发酵能力

产 品	总能力(米 ³)
废 水	2800000
啤 酒	128000
面包酵母	19000
抗生素	10000
奶 酪	3000
面 包	700

1.2.3 生物工艺过程中引用灭菌技术的阶段 二十世纪40年代生物工程进入了一个新时代,那就是为了保证在没有杂菌污染的情况下进行特定的生物学过程,在微生物的大量培

养中用了复杂的工程技术。无菌操作的过程是，通过事先对培养基和生物反应器灭菌和采取工程措施杜绝污染物的介入，使反应器内只存在所需要的生物催化剂。通过这种方法生产的产品有抗生素、氨基酸、有机酸、酶、甾体化合物、多糖和疫苗等，这表明生物工程已愈来愈有活力。这类生产过程多数比较复杂，而且成本较高，一般只适合生产高价值的产品。虽然其中有不少产品产量已相当大但与食品和饮料生物工程中使用的老系统相比，这类产品无论在生产规模还是在经济收益方面都还相距很远（表3）。

表3 英国发酵工业的销售额

工业部门	销售额(百万英镑)
酿造	3190
酒精	1860
乳酪	415
苹果酒、葡萄酒	190
面包	150
抗生素	100
酸奶	65
酵母	25
柠檬酸	20

1.2.4 生物工程工业的新领域与可能性 近十年来，分子生物学和生产过程控制方面已取得了突出的进展。它不仅为开辟新的生物工程领域提供了新的激动人心的机会，也为大大提高现有生物工程工业的经济效益提供了可能。正是由于这些发现与发展，才使我们对生物工程在将来世界经济方面的作用感到如此振奋人心。

那么，这些新技术包括哪些方面呢（表4）？

表4 促进生物工程发展的技术

重组DNA技术

组织培养

原生质体融合

单克隆抗体的制备

蛋白质结构的改变（“蛋白质工程”）

固定化酶与细胞催化剂

生物分子传感作用

反应器与生产过程的计算机控制

新的生物催化反应器设计

（1）基因工程 通过有性重组和（或）突变育种方法，对重要的工业生物基因组施行遗传操作，早已成为工业遗传学家具有的各种创新技能的一部分。重组DNA新技术包括：轻轻打破活细胞，从细胞中提取和纯化DNA，然后用具有高度特异性的酶筛选所需的DNA片断；找出含有某一目基因的片断，并对其进行分析、筛选和纯化；用化学法将带有目的基因的片断结合到DNA载体分子上，然后再将杂种DNA嵌入选定的细胞中进行繁殖和细胞内合成。重组DNA技术的出现使得对基因组的操作更能得心应手，种属间杂交不亲和性的问题也能较容易地得到解决。基因工程的潜力是不可估量的，人类的胰岛素和干扰素基因已被成功地转移到微生物细胞中并在其中得到了表达。原生质体融合、单克隆抗体的制备以及组织培养技术的广泛应用，包括从悬浮培养的细胞中再生的植株，已经对生物工程的发展产生了深刻的影响（第二章）。

（2）酶工程 离体酶早已进入到许多生物工艺过程之

中。随着适当的固定化技术的发展，生物催化剂可以反复使用，因此可以进一步发挥它们的催化特性。利用固定化的细菌葡萄糖异构酶生产高果糖浆（年产量300万吨）是这方面最突出的例子。进一步的发展是将完整细胞固定化作为生物催化剂（第四章）。

（3）生物化学工程 生物反应器在生物工程过程中作为起始物（即底物）与终产物之间的纽带起着中心的作用（第三章图1）。在生物反应器的设计、对生产过程的监测技术以及用计算机控制发酵过程等方面均已取得重要进展。但是，在生产过程控制的应用方面，与化学工业生产相比，生物工程工业落后了许多年。在生物工程产品的加工（出料加工）方面，一些新的探索将使所有各种生产过程的经济状况得到改善。现在，迫切需要设计出有效的回收工艺，特别是对于高价产品尤其如此。比如，L-天冬酰胺酶的回收成本与发酵成本的比值为3.0左右，而乙醇则只有0.16（第五章）。然而，出料加工在生物工程中还是个碰运气的课题。

（4）工程产品与系统 由于能够大量生产生物分子（如抗生素、酶），并且有了蛋白质和细胞的固定化技术，用于生物诊断和生物解毒的全新传感器正在得到发展。这种系统可以与微电子装置配合，最后与计算机配合，因此可以对许多生物工程的工业与服务进行精密的程序控制。

生物工程有两大特点，一是与实际应用相联系，二是多学科的合作。生物工程的实施者们要利用来自化学、微生物学、遗传学、生物化学、化学工程和计算机科学等学科的技术，他们的任务主要是对生物化学催化作用起着根本和不可替代作用的生产过程进行革新、发展和最优化操作。生物工程并不构成一门新的学科，它只是为多学科的专家们作出更

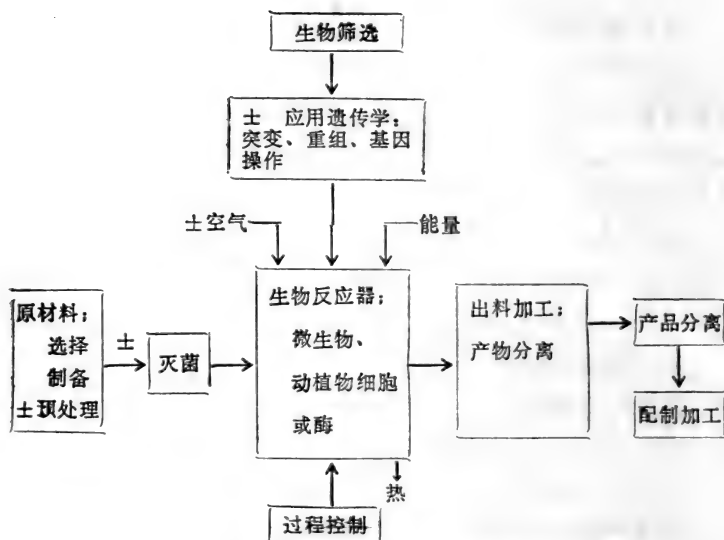


图1 生物工程过程示意图

大贡献提供的一个新领域。

必须知道，生物科学与生物工程有着明显的区别。生物科学是指生物学知识的获得，而生物工程则是指生物学知识的应用。在大多数情况下，生物工程过程是在低温下进行，它们耗能少，并且一般使用便宜的原材料为底物。

生物科学家和各专业的工程师们都能在各自的领域对生物工程作出贡献。生物工程学家这个词已悄悄地进入了我们的词汇，它指所有利用自己的知识与技能致力于生物材料加工过程的科学家和工程师。然而，这个词不宜继续使用，因为它只能导致混乱。相反，生化工程师是指生产过程的工程师，其作用是将生物科学家的知识转化为实际操作。生化工程师应当在生物学过程的设计和操作方面受过基本的科学训练。

世界上不存在完美无缺的生物工程学家，因为没有任何人能够在微生物学、生物化学、分子生物学、化学和加工工业等方面均为专家。但是，对参与生物工程实践的人来说，必须力求懂得其它相关学科的语言。不同学科的专家们缺乏共同的语言无疑是充分挖掘生物工程潜力的最大障碍。

1.3 生物工程的应用

生物工艺过程可以根据产品的规模与价值大小归类。例如，规模大价值低的产品或服务，包括水的净化、废水和废物的处理以及甲烷、乙醇、生物量和动物饲料的生产等。规模较大价值中等的产品则包括氨基酸、有机酸、食品、面包酵母、丙酮、丁醇和某些多聚物。规模小而价值高的产品有抗生素、干扰素、疫苗、单克隆抗体、酶和维生素。生物工程也可以根据产品生产所需的工艺技术水平来考虑（表5）。

只根据工业发展的规模而不管生产单位的大小，则目前和今后的生物工程还可以方便地分成三个领域。

（1）小规模生物工程，特别关系到那些只能通过生物学手段才能经济地生产的生化产品。这类生物工程存在已久，并且正在迅速发展，特别是新产品领域尤其如此。但是，为了争夺商品市场，工商企业界内竞争十分激烈。这类产品包括维生素，单克隆抗体和干扰素。

（2）中等规模生物工程：将与以石油为基础生产现行的日用化学品的技术竞争；与生产包括蛋白质和脂类在内的天然产品的农业竞争。

（3）大规模生物工程：将与供作燃料用的有机化合物的初级原料和高吨位工业产品的石油和煤炭竞争。

表5 生物工程：以技术水平为基础

类别	输入	输出
高水平	高投资； 常需精密控制的尖端工厂与加工设施； 高的保养成本； 高技术的操作者	用于医疗和人类食品及食品添加剂的高价产品，大规模连续操作。
中等水平	中等投资； 复杂程度较低的操作；	发酵食品和饮料、动物饲料、生物肥料与农药、粗酶、要求精密操作与控制的废物管理过程
低水平	低投资、大规模操作、简单的设备（通常为土设备）； 劳动强度大的操作； 常用腐化系统、 农村级技术。	低价产品（常与污染控制、环境卫生、燃料与食品供应有关）、广泛使用因地制宜的混合发酵。沼气；由农业食品 and 食品废物提供的微生物蛋白；传统发酵食品与饮料；蘑菇生产。

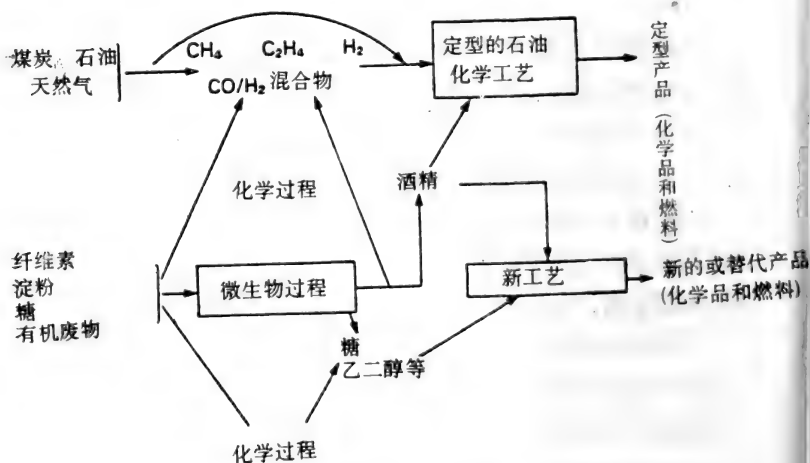


图2 大吨位产品竞争图

尽管目前大中型生物工程很少取得真正的经济效益，但在下一个20年中，以植物材料为原料建立起一些大型微生物生产项目看来是比较有把握的（图2）。这些产品的市场已经存在，并将促进其它具有经济效益的生物工程产品的开发。

1.4 生物工程的发展

生物工程要继续得到发展，在很大程度上取决于以下三大前提：

（1）要扩大用传统和遗传工程方法生产的有价值的产品的范围。

（2）能够从可更新的资源中获得原材料。

（3）必须更加认识到，生物工程方法在许多情况下与现行植物材料的化学加工方法相比要更经济合算。

中大型生物工程发展的一个最重要的方面是合适的原材料与加工底物的来源问题。底物的成本可占终产品成本的30~70%。底物的可用性取决于技术和政策两个方面。因此利用各种有机物质生产的汽油酒精不可能在经济上产生特别的吸引力，但在政策上却可以成为对付石油进口逐步升级的筹码。

由农业、林业和工业有机废物产生的可更新资源正在变得越来越重要，因为它们通过生物工程处理后可为食品、饲料、基础化学制剂以及能源的生产提供一种政策上和战略上的重要基础。然而，要达到这个目的，无论是在生物工程的

各个组成成分方面还是在土地管理方面均需要作出全面的规划。

1.5 生物工程的战略规划

每个生物工程方案都需要对可用资源、经济、环境影响以及操作者和使用者的健康与安全等问题不断进行估价。如果规划正确，生物工程可以有助于达到自然资源、人类需要和环境之间的适当平衡。

对生物工程的发展来说，尤其重要的是要有一支训练有素的生力军。在中小学阶段就应使学生开始了解生物工程，然后通过技术和学位水平的专门训练造就出工业和研究所必需的专门人材。没有训练有素的合格人材，要充分发挥生物工程的巨大潜力是不可能的。特别是中高级水平的生物工程，必须具备训练有素的人材和管理条件才能进行(表5)。

此外，在考虑将生物学发现应用于将来的工业发展时，不应该低估时间的重要性。从新发现的产生到将新发现成功地用于商品化生产一般需要5~20年时间。因此，包括“新的”生物工程在内，在1990年以前难于指望有很大的发展。

这本小册子并不想对现行生物工程实践中的许多不同方法进行描述与分析，而是企图对已经成功的生物工程的核心领域所依据的基本原理进行阐述。

本章提要

生物工程可以认为是生物机体与生物学过程在制造业中的应用。生物工程涉及的学科和课题很多。虽然目前的工作非常尖端和新颖，但它们大都有自己的历史渊源。

生物工程的特定过程是由微生物、植物细胞、动物细胞

或它们的产物（如酶）催化的。生物工程中的有机体可以作为生物量收获，可以用于化学转化过程，也可以作为包括酶和单克隆抗体在内的生物学活性分子的来源。

基因操作技术为应用遗传学开辟了新的天地，并且为创造全新的工业过程（如用细菌细胞生产人干扰素）创造了条件。在生产与控制工程以及发酵工程领域正在取得重要进展，它们将进一步推动生物工业的发展。

生物工程是一个发展中的领域并且涉及众多的生产部门（如农业、食品、饲料、医药、能源和水生产等工业部门）。在将来，新药、激素、疫苗和抗生素生产、经济可靠的能源与化学饲料（长远目标）的生产以及改进环境和废物管理等方面，生物工程都将发挥重要作用。生物工程主要依靠可更新和可再循环的材料，因此可以在能源越来越昂贵和越来越紧缺的情况下较好地满足世界的需要。

第二章 应用遗传学

一般说来，开发一项生物工艺过程首先要找到一种适用的生物。人们期望这种生物能提供一种产品或为这一工业带来经济效益。实际上，遗传学工作者首先要选择一种能产生所需产物的生物。找到适用的生物后，可在必要时应用常规育种或诱变育种方法诱发遗传变异，提高所需产物的产量。优良生物的选育是一项既繁重又费时间的工作。到目前为止，可供遗传学工作者使用的方法多数带有机遇性和不精确性。可喜的是，新的遗传学技术——原生质体融合与重组 DNA 技术正在取得新的进展，它们可直接将有用的遗传性状嵌入被选择的生物体中。因此，生物工程可为微生物以及动植物细胞创造出全新的能力，使它们产生原来无法产生的物质。

对有潜力的工业生物进行改良时，提高生产率不是应用遗传工作者的唯一目的。比如，他们可以将抗病毒感染特性和高的遗传稳定性结合到缺乏这些特性的生物体中；可以减少和消除有害副产物的形成；还可以除去产品异味、令人讨厌的颜色或粘性等。

理想的工业培养物应具备以下特点的大部分(或全部)：

- (1) 纯种培养；
- (2) 遗传上稳定；
- (3) 容易繁殖；
- (4) 生长迅速；
- (5) 产品生成率高；
- (6) 不形成有毒副产物；
- (7) 可经受遗传操作。

工业上使用的培养物一般通过三个阶段产生：(1) 研究培养物——研究目的在于寻找某种有用产物；(2) 发展

培养物——已具备一定重要性的研究培养物；（3）生产培养物——实际用于工业生产的培养物。

最后的培养物可以与原始的研究培养物相同，但更常见的是，为了提高生产率，对研究培养物要进行一系列处理。遗传处理后的生物将在代谢功能方面远远胜过其野生型。这一点只有通过生产期间的生物生长进行最大程度的控制才能实现。用野生型生物培育工业用生物时需要改变遗传信息，排除不需要的特性，或者甚至引入一个全新的特性。

寻找适用的生物并对其性能进行改良是目前多数生物工程过程的基本环节（图3）。

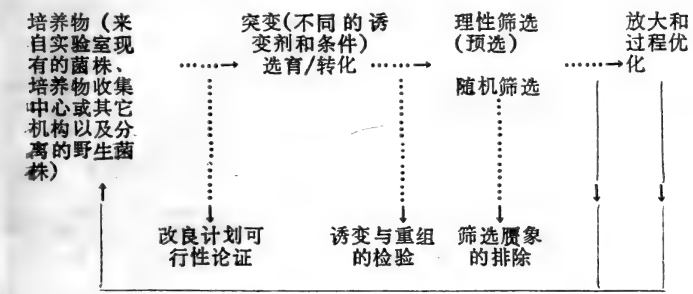


图3 菌株改良流程图

2.1 选育和筛选

从总体上看，生物工程的主要力量应放在筛选产生新生物的方案上，既可以从某些自然种，也可以从确定的生物中通过突变和杂交（包括遗传工程）来产生新的生物。这些新的生物必须根据产物效用进行筛选，并且能在足够大的规模下繁殖生长和提取所需产物，然后再对产物进行严格评价。

筛选可定义为利用高度选择性的方法，从大群体中识别和分离有用的特定微生物或代谢产物的过程。分离物的下一步处理包括遗传改良和培养物的保存。充分开发筛选能力的一个主要障碍是缺乏适当的筛选方法来鉴别所需产物，当有一些培养基组分存在时尤其如此。

目前生物工程利用的生物主要是微生物。下面讨论的筛选方法主要针对微生物。

从环境中寻找用于生物工程过程的新菌种通常有三种选择，即采样地的选择、分离特定微生物的物理方法的选择以及获取选系的方法的选择（表6）。

表6 产生菌的选育

生态学途径	遗传学途径
<p>策略： 建立已知菌种的分离菌株文库， 用稀有菌种丰富菌种文库， 勘察异常生境和发展新菌种分离技术。</p> <p>分散技术： 土壤稀释， 漂浮， 颗粒沉积物和空气采样， 小生境生长物，</p> <p>选择与富集技术： 选择性物质，如几丁质； 选择性抑制剂，如放线菌酮、利福平； 物理环境，如温度、pH，Eh。</p>	<p>策略： 产生适合于提供前体的生物合成 突变体； 制备产生抗生素的杂种菌株， 利用基因克隆改变生物合成方向。</p> <p>技术： 突变和选择， 重组（通过接合作用、原生质体 融合、真菌的有性和准性生殖循 环），转化和转导（利用原生质 体强化），基因克隆（特定基因 的靶位直接克隆），随机猎枪克 隆产生基因文库。</p>

虽然许多新的产生菌是野生型的，并从自然环境中分离得到的，但通过实验室操作，由现有基因组产生新基因组的工作仍不失为主流。改变生物体可分别通过突变、重组、转化、转导和基因克隆等途径进行，或相互组合进行（表6）。

由于自然选择，更由于遗传操作，工业上的所有重要微

生物都经过了某种形式的筛选。筛选方案的设计对于有效识别新的基因型是至关重要的。筛选可分为两种基本类型：

(1) 非选择性随机筛选 针对特定性状分别测定所有的分离菌株。

(2) 理性筛选 其中包括一些预选环节。

随机筛选可能很花时间，因为每个分离株都必须仔细研究。在抗生素的生产研究中，常使用数以千计的摇瓶震荡培养单孢子分离菌株。琼脂平板技术可加速这一过程，但最好在使用摇瓶以前用作初筛。这样，大量的分离株或突变体可以出现在平板上，然后放到不同的环境条件下，通过电视监测和计算机控制，自动记录它们各时期的反应。

另一方面，理性筛选较多地利用对特定产物形成的生物化学的了解，利用所需基因型的某种特性建立选择过程，这个特性不一定是我们需要的那一种，但便于对之分辨等级与分析。最佳的理性筛选方法应能选择性地杀死所有不需要的基因型，从而使能用于常规测定的分离株增加。例如，最近表明，顶头孢霉的抗生素产量与蛋白水解活性相关，因而提出了一种可能的筛选方法。

在使用筛选方法分离出有潜在价值的微生物后，还需要在生产条件下最后确证其效率。用新的或现有的微生物进行产物优化过程，还包括最佳培养方法的选择，确定采取固体培养还是液体培养，分批培养还是连续培养。用于菌种繁殖的培养基类型对产物形成的基因型表达可能影响很大。因此，培养基的成分可以影响生物量的浓度、产物形成速率、产物形成时间、产物分解速度和产生菌的稳定性。但是，生产环境不可能一成不变，成功的生产很可能还需要对培养基和环境控制参数进行调整。

菌种退化是生物工程中的常见问题。菌种稳定性受遗传控制，但可通过对环境因子（如培养基）的特殊控制或通过对于那些引起遗传不稳定性的因子的抑制来改善。

2.2 菌种的保藏

通过自然选择或遗传操作获得新的微生物后，必须贮藏或保存，以减少遗传性能的退化。微生物的保存、制备和繁殖必须达到特定的可重复性标准。工业微生物的保存是生物工程基础工作的必要组成部分。没有任何保存方法对所有工业都适用。工业微生物的具体保藏技术通常保密很严。实际上，多数工业微生物的保存采取以下方法之一进行：

- (1) 在琼脂培养基上进行定期继代培养；
- (2) 减少代谢——矿物油覆盖、冷冻或低温保存；
- (3) 干燥——干沙、硅胶、土壤或滤纸；
- (4) 冷冻干燥——由于使用方便而被广泛采用。与以上方法相比，冷冻干燥可获得更好的稳定性。

(5) 超低温冷冻保藏（ $-70^{\circ}\text{C} \sim -196^{\circ}\text{C}$ ）——该方法成本高，但适用的生物范围广，并且保存的生物存活率较高。

全世界的培养物收藏机构在生物工程中发挥着越来越重要的作用，他们为过去、现在和将来提供着越来越多的纯系生物。重要的操作菌株必须保持较强存活力和较高繁殖率。特别是许多经过遗传操作的新菌种具有一定程度的不稳定性，保藏的目的在于必须使菌种变异减少到最低限度。

本章的其余部分将较详细地介绍目前可供遗传学家改变工业上重要生物基因组的各种技术。

2.3 诱变育种

经过初筛分离出有用的菌种后，可通过几种途径提高生产率。这些途径包括改变培养基和发酵条件（第三章）、突变（自发突变或诱发突变）和杂交育种。鉴于突变是导致一切遗传变异的根源，所以现已成为工业微生物学中最重要课题之一。此外，工业上使用的许多重要微生物，如产黄青霉和米曲霉不表现通常的性征，因此它们不容易杂交。由于这个原因，在培育现行使用的许多产生菌时曾大量利用诱变技术。事实上，诱变育种已成为许多工业过程中提高生产率的主要手段。长期以来，利用诱变技术提高生产率或效价的过程包括用青霉、头孢霉菌和链霉菌生产抗生素、用曲霉生产有机酸和酶、用各种细菌品系生产氨基酸等。到目前为止，新的遗传工程技术还无法取代诱变育种的常规工作。

现在认为，提高发酵产物产量的最有效方法是，利用诱变处理，再进行优株选育。主要困难是突变频率低，选择不得不在包括大量非突变体的大群体中进行。

工业菌株通过大突变获得改良而产生更多有效产物的例子很多。其中以产生四环素的链霉菌菌株最为突出。曾经发现，金霉素链霉菌的一个突变株S-604能合成其亲本生产株不能合成的6-去甲基四环素。现在，这一突变株已成为主要的商品生产菌之一。

但是，通常菌种改良的主要途径仍利用微突变。这种突变一般可稍稍地改进产物形成（5~10%）而不会影响其表现型。连续利用小的突变可使与原来基因型的生产率有关的遗传因子的频率增加。这方面最有意义的例子是产生头孢霉

素的菌株以及产生青霉素的产黄青霉菌株的选育。

诱变剂的选择 虽然诱变剂可分为物理的（辐射）和化学的两大类，但这对工业遗传学家关系并不大。诱变剂的选择，主要看选用的技术能否产生可供选择的尽可能广谱性的突变体。许多诱发的突变并不是由于直接损伤DNA所致，而是细胞内DNA的修复过程作用于这种损伤使之造成碱基序列不可逆改变的结果。产生这种现象的诱变因素有紫外线、电离辐射、胸腺嘧啶饥饿和某些化学诱变剂，如丝裂霉素C、5-溴尿嘧啶、甲基磺酸乙酯、氮芥和硝化呋喃等。

诱变因素产生特异性诱变作用的分子基础还不完全清楚，但知道这种特异性的产生在很大程度上取决于诱变的修复过程。实际上，生产菌株可能对特定的诱变因素不起反应，此时可通过从不同修复途径起作用的几种诱变剂交替使用。此外，正确选用诱变剂量可大大增加诱变群体中所需突变体类型的频率，这样可以在整个群体的筛选时增加选择的机会。

生物的突变率受遗传控制，并可通过增变基因和抗增变基因来改变。这些基因可改变生物体，产生自发或诱发突变，或同时影响二者。在筛选计划中，增变菌株很重要，因为它们中有的可在诱变后的幸存菌株中产生高频率的突变体，因此可提供十分有效的变异输入。

诱变后的环境可影响整个突变频率和特异性。因此，诱变后的培养物在完全培养基上培养比在基本培养基上培养更有利于提高突变体的产量。

大多数生物具有与其它既相似但遗传上又不同的个体交换核物质的机能，由此可产生遗传型均不同于双亲的后代。这个过程叫杂交。杂交是促进有用的遗传物质重组的一种基

本方法。突变只改变一种生物的基因，而杂交重组则使基因或基因的一部分发生重新排列，并将两种或两种以上生物的遗传信息带到一种生物中。杂交育种方法早已在动植物育种中采用，并且在近期的许多生物工艺过程中被用于微生物的改良。杂交过程大体上可分为两种方式：一种是真核生物的有性杂交；另一种是原核生物与某些不表现真正有性过程的生物以及大多数真核生物组织培养中存在的准性杂交。在生物工程中，真菌与细菌是实施杂交计划的主要对象。

2.4 有性杂交

在有性杂交过程中，相对交配型产生的单倍体核进入同一个细胞后（核配后）将发生融合，成为二倍体核，然后进行减数分裂。减数分裂期间，染色体发生重新排列和组合使遗传因子发生重组（图4）。这种同源重组过程在产生新的基因型方面非常有效。譬如，如果两种生物有 n 个不同的基因，则该基因组间发生重组后可产生 2^n 种基因型。如果两个菌株分散在成千上万个碱基对中只有12个碱基对不同，将产生 $2^{12} = 4096$ 种新的基因型。

有性杂交在许多生物中可能由于繁殖系统的存在而复杂化。这些繁殖系统可通过阻止自交产生的近亲交配来保证群体的异交。繁殖系统以这种方式促进了适当遗传物质的连续混合。许多高等的子囊菌和担子菌已经证实了繁殖系统的存在。这些繁殖系统已被广泛用于各种蘑菇的商业化生产，如二孢蘑菇、香菇和草菇。

酵母不同菌株的有性杂交技术，已被用于现代化工厂方法快速生产面包、提高酒的酒精含量和酿造特殊啤酒时除去

几乎所有碳水化合物等方面。

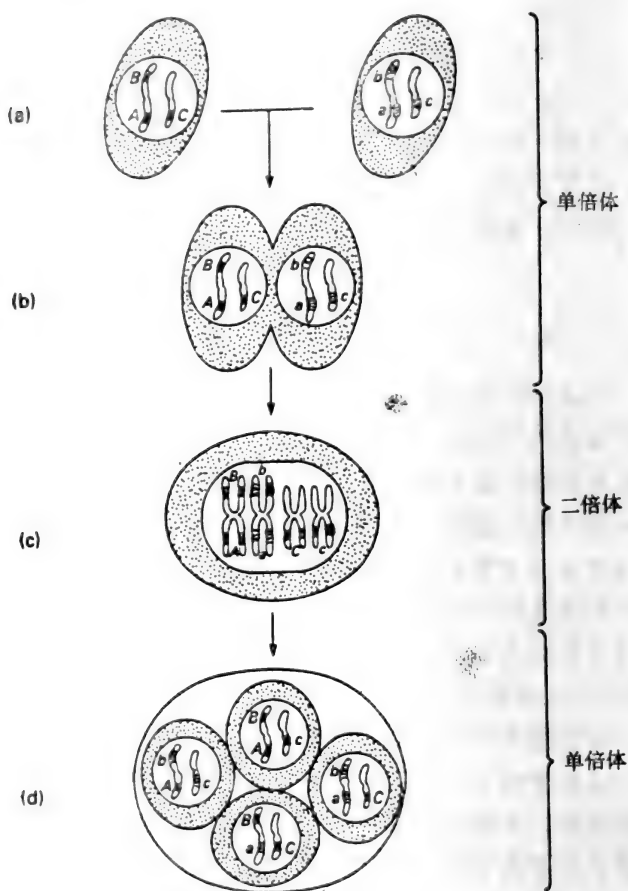


图4 真核生物的减数分裂

真核生物的遗传重组过程包括染色体的部分交换和染色体的重新分配。典型的酵母菌在生活周期的大部分时间是单倍体，具有15或15条以上染色体的一

个染色体组，本图只画出了其中的2条染色体。相对交配型的两个细胞可融合（a），然后核融合（b）形成具有两套完整染色体组的二倍体核。在减数分裂期间（有性生殖期）染色体成为由两个染色单体组成的双倍结构（c）。同源染色体配对并通过交叉交换部分染色单体。然后形成四个单倍体的有性孢子（d）。每个孢子可获得不同于双亲细胞（黑色与划线）的基因新组合：相同染色体上的基因（A, a; B, b）因交换而重组，不同染色体上的基因随染色体对成员的重新分配而带走。

2.5 准性过程

目前生物工程利用的重要微生物中显示明显有性重组能力的很少。但是，这些微生物可通过准性过程获得有限的重组。准性过程包括所有营养细胞中发生的不经过减数分裂的基因重组过程。

准性过程利用多种细胞机制将不同来源的遗传物质带到一起。已经在生物工程中实际应用的机制包括接合、转导、转化、有丝分裂重组和原生质体融合。

细菌的**接合**是指遗传信息通过细胞与细胞的接触从一个细胞转移到另一个细胞的过程。接合现象也可在真核生物的单倍体配子融合形成二倍体的合子时发生（图5a）。接合是适应性最强的转移方法之一，而且这种方法对于种内和种间遗传物质的转移最为有效。在细菌中，接合通常以质粒为中介，甚至包括在Hfr和有关菌株的特例中，曾经是质粒的额外遗传因子已经插入成为染色体的一个部分。接合转移的同时，发生DNA复制，可导致转移的DNA与受体基因组相整合。接合虽是革兰氏阴性细菌的特性，但在革兰氏阳性菌中也有发现。首次发现的细菌接合系统包括两种不同的大肠杆菌

菌株细胞与细胞的接触，然后通过这两种接合型中的性伞毛或管子进行遗传物质的转移。形成性伞毛的细胞含有一个额外的遗传成分，即F因子或质粒，它控制着细菌环状DNA的断裂以及该DNA向其它细菌细胞的转移。此后，两个基因组在受体细胞中发生重组。寄主广谱性质粒为许多革兰氏阴性细菌间的基因转移提供了可能。接合已被用于抗生素生产菌（链霉菌和诺卡地菌）的菌株改良。

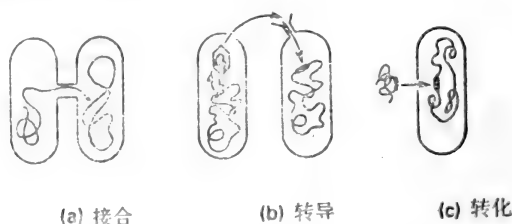


图5 准性过程的机制

(a) 接合，(b) 转导，(c) 转化。

转导是指遗传物质通过病毒载体由一个细胞转移到另一个细胞，随后通过重组并与受体基因组相结合的过程(图5b)。溶源性细菌的噬菌体（即细菌病毒，如 λ 噬菌体）可将细菌的部分基因组整合到自己的基因组中，并将其转移到另一个宿主细胞。在适当的条件下，这种细菌DNA可以在新的细胞中被表达。英国帝国化学工业公司利用转导，对在普鲁丁过程中生产单细胞蛋白所用的细菌进行了成功的改良。在动物细胞方面，猿猴病毒40 (SV40) 和老鼠多瘤病毒正在引起人们的兴趣，而在植物细胞方面，花椰菜花斑病毒(CMV)作为一种类型的病毒性传递媒介，已经引起人们的特别关

注。CMV是一种寄主范围局限于十字花科的双链DNA分子。这种病毒系统必将在植物的生物工程中发挥重要作用。

转化是指来自一个细胞的DNA被另一细胞摄取并稳定保持的遗传物质单向转移的过程。转化已在细菌中广泛应用(图5c),在酵母和链霉菌中正得到广泛和迅速的开发,但在线状真菌和动植物细胞方面至今只有少数成功的实例。转化DNA在导入细胞之前可进行诱变等体外处理和操作。转化过程存在的主要缺点是大多数细菌群体都只能获得很小比例的转化细胞(大肠杆菌约为0.1%,枯草杆菌约高出10~100倍)。大肠杆菌实验表明,大的质粒DNA分子(>20kb)比小分子转化效率低。转化已成为以质粒为载体的遗传工程的主要方法,这将在本章后面部分予以讨论。

有丝分裂重组对于线状真菌特别重要。某些营养期为单倍体的真菌可以有少数核融合形成二倍体。真菌无性周期的二倍体阶段,是由处于杂合状态的营养核发生融合的结果。有丝分裂重组过程包括以下几个时期:(1)两个单倍体的菌丝体之间形成异核体(两个或两个以上不同细胞核共用一种细胞质);(2)少数异性核发生融合(频率约为 10^{-6});(3)二倍体核内发生有丝分裂的交叉(频率为 10^{-2} /每次核分裂)并产生染色体间的交换;(4)二倍体核还原为单倍体状态,即单倍体化,频率约为每次核分裂的 10^{-3} (图6)。这种有丝分裂重组使我们能对没有有性生活史的生物进行遗传分析和控制繁殖。就重组效率来讲,有丝分裂重组比有性重组效率低得多。这种准性杂交方式在很多工业微生物中均有发生,如产黄青霉、米曲霉和顶头孢霉。由于工业上保密的缘故,这一系统在工业实践中的应用究竟有多广很难了解到。然而,可以肯定,这一系统在柠檬酸和青霉素的生产菌

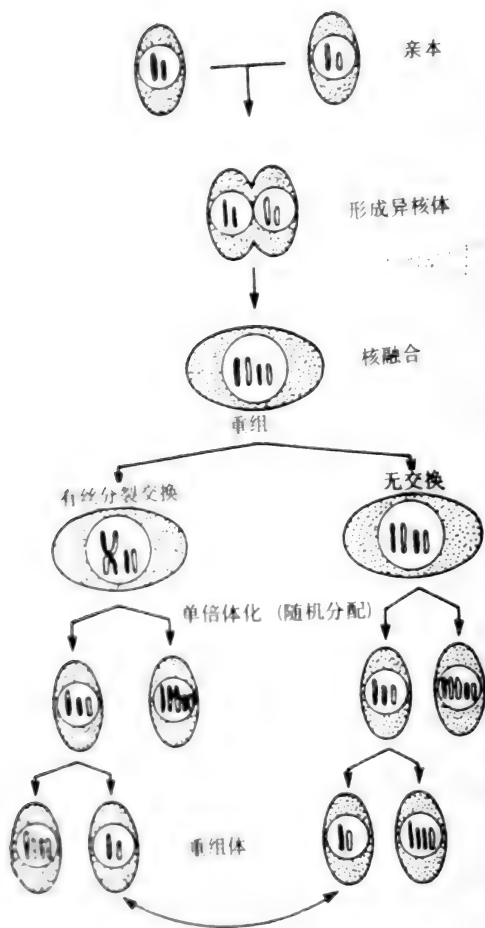


图6 有丝分裂重组示意图

中已经获得成功的利用。有丝分裂重组在一些高等植物和动物的组织培养中也有过记载。

实现准性杂交首先要求所需细胞能够融合。由于同基因和异基因的不亲和性，细胞融合存在着许多障碍。但是，现在这些不亲和性或种间的障碍，在许多情况下，可通过利用特定的实验室方法使细胞的原生质体直接融合，或通过转化的方法用分离的DNA感染等方式来克服。

2.5.1 原生质体融合 不同生物间基因重组的自然屏障通常主要是细胞壁。如果用制备原生质体的方法来消除这一屏障，并认识到细胞膜具有较相似的组成，那么，诱导不同物种的原生质体融合并形成杂种细胞也是可行的，这样便把它们的基因结合在一起。诱导微生物原生质体融合是发展十分迅速的领域之一，而且，不论在基础和应用研究方面均已较快地积累了资料。早期为建立游离原生质体和细胞再生技术的许多研究，在很大程度上决定了今天细菌、真菌和动植物细胞原生质体融合与再生技术的成功。现在，已经能够常规地使大多数微生物细胞形成原生质体。

虽然已有报道能用机械方法和其它非酶学方法游离原生质体，但主要的研究方向，仍倾向于使用溶菌酶游离原生质体。这种溶菌消化作用的几个主要环节就是酶、渗透压稳定剂和所用的生物材料。

酵母原生质体的制备可用市售的蜗牛消化液制剂进行。这种制剂与蜗牛酶、glusulase酶和硫酸酯酶一样有用。一般来说，大多数市售溶菌制剂对于制备线状真菌的原生质体不很有效，但对于其它许多微生物，特别是对链霉菌和某些线状真菌溶菌则效果很好。在大多数情况下，产生菌在合成细胞壁消化酶复合体时，要求培养基中有诱导底物存在。有种生

产细胞壁消化酶的新方法，其作法是将产生菌株放在比正常碳源含量低（如葡萄糖、蔗糖含量低），但含有比较纯的被处理菌株细胞壁的培养基中培养。产生菌的有效生长需要产生足够的细胞壁消化酶，以便启动那些必需的低分子量能源。

一般说来，用指数期细胞比用稳定期细胞更容易产生原生质体。由此表明，细胞壁的化学组成在细胞生长周期中发生着变化。

化学稳定剂是维持去壁后原生质体渗透压所必不可少的。无机盐、糖、酒精被成功地用于维持去壁后游离原生质体的完整性。如果没有渗透压稳定剂，去壁后的原生质体会很快破裂。

原生质体中有很大部分可以产生新细胞壁并随后完全恢复正常生长。因此，只要有丝分裂重组能在融合的离体原生质体间发生，即可在恢复正常生长后产生遗传上被改变的有活力的生物。

不管是相似菌株还是相异菌株，它们发生自然原生质体融合的频率都很低。但是，由于使用了聚乙二醇（PEG）作为原生质体融合的促进剂，融合频率至少提高了一千倍。利用PEG诱导真菌原生质体融合的方法学研究表明，对于分子量4000或6000的PEG制剂来说，以25%—40%的浓度诱导融合的效果最佳。 Ca^{2+} 离子是获得高频率融合必不可少的。原生质体融合的具体过程是，首先由于广泛脱水和形成各种凝聚体导致原生质体胶合，然后原生质体收缩并且高度变形，膜内蛋白质颗粒在紧密接触的部位发生转位，随后这些蛋白质颗粒相互并合。在蛋白质裸露的相邻细胞膜之间，类脂与类脂相互作用，在 Ca^{2+} 离子参与下，这些类脂分子发

生重组。这就使得接触部位的小面积细胞膜相融合，形成小的细胞质桥。随着细胞质桥的不断扩展，两个原生质体最后完全融合为一体。

最近，研制了一种新颖的可用于原生质体融合的电场融合方法。电场融合是一种迅速而温和的过程，利用它可使相同的细胞融合成为巨型细胞，或使无亲缘关系的细胞形成杂种，还可以把细胞内的物质包裹起来。利用电场融合法使细胞融合时，细胞被置于低水平、非匀质的高频电场中，细胞在电场作用下定向为链状。这时，可用直流电在相邻的细胞膜处打开微孔，使细胞内含物互相混合并实现细胞融合。这种方法还可能会改变细胞外膜的透性，使基因大小的物质被包在里面。

来自不同菌株的两个原生质体融合后，形成的细胞叫异核体，因为它含有来自不同遗传来源的细胞核。异核体内，不同基因型的单倍体核之间以及同种类型的核之间可发生核的融合，即二倍体化。不同基因型的单倍体核融合后形成杂合的二倍体核，而相同基因型的单倍体核融合后将形成纯合的二倍体核。接着，可使融合后的原生质体（由单倍体和二倍体核混合构成）再生为具有正常繁殖能力的成长的菌体。

在此长出期期内，二倍体核可进行分裂，偶尔伴有有丝分裂的交换，并因此产生出新的基因组合和连锁关系。这些重组为菌体带来了正常性别的一些好处。

通过这种准性过程方式，原来为单倍体的生物可获得新的二倍体品系。然而，在很多情况下，这种二倍体品系将发生单倍体化。由于有丝分裂重组导致了新连锁群的产生，一些新的单倍体菌株的基因型将不同于双亲中的任何一方。在线状真菌中，单倍体化过程常常发生在分生孢子形成时期，

其中每个分生孢子都是只有一个核的单倍体。

通过原生质体融合改良工业菌株必须做到三件事：

- (a) 产生能存活的原生质体；
- (b) 获得高的融合频率；
- (c) 将融合后的原生质体再生为生长的菌落，并在菌落中实现二倍体化和单倍体化。

对于链霉菌和其它抗生素产生菌的菌株改良来说，原生质体融合似乎是最有希望的方法。这一方法很可能导致新的抗生素结构的产生和高产基因库的扩大。最近，有人实现了两种不同类型酵母细胞的融合，再生的细胞被繁殖和用于白葡萄酒的生产。对于抗生素产生菌的改良来说，细胞融合技术比重组DNA技术更有希望，因为这种改良过程涉及许多基因。线状真菌的原生质体融合以及种间原生质体融合已被成功地用于菌株改良。对于种间异核体和没有明显有性周期的线状真菌来说，原生质体融合似乎是基因重组的唯一手段。

从大多数植物种可以制备原生质体，但能够再生细胞壁、分裂并最后分化为正常植株的植物种则很少。许多重要作物都属于后种情况。通过植物的离体原生质体融合技术获得新的体细胞杂种，被认为是植物科学上的重大技术进步。

实际上，原生质体在诱发融合后，它们会在液体培养基中再生细胞壁并进行有丝分裂。分裂的结果将产生由亲本体细胞、同核体和异核体（即体细胞杂种）共同组成的混合群体。从该群体中鉴别和筛选体细胞杂种可通过遗传标记的表达、生长所需的生理学要求或显微操作等手段进行。不同物种的原生质体融合有时也能产生杂种，但这些杂种总是不育的，无法与育种方案结合利用。只有能够与传统的育种方案

相结合，体细胞杂种才可能在作物改良中发挥作用。迄今为止，农业生产上还没有一个新品种是用原生质体融合的方法培育出来的。然而，在不远的将来，用原生质体融合技术培育出新的作物品种是毫无疑问的。原生质体融合技术将开辟一个创造性的并且有利于农业发展的新天地。

动物细胞也可进行原生质体融合，但没有机会获得完全发育的动物体。但是，无论对于植物还是动物的组织繁殖，原生质体融合技术都可作为改变遗传构成的有价值的手段。

生物属间和界间原生质体融合的异常例子已有发生，如，酵母原生质体与鸡血红细胞、动物与真菌的异核体以及细菌与酵母的融合。这些实验虽然没有立即获得有价值的遗传后果，但它们说明了将有可能通过分类学上十分远缘的细胞的融合实现物种间遗传因子的转移。

2.5.2 细胞融合 细胞的直接融合已成为单克隆抗体形成的基础——后者是现代生物工程中最活跃和最富有成就的领域之一。单克隆抗体是由单一来源的细胞，即克隆产生的只识别一种抗原的抗体。

制备抗病疫苗是医疗上存在已久的领域。疫苗可以使身体产生抗性，即产生一定水平的抗体，并建立起一个预备的、当病原菌以毒性形式发生时能生长并产生抗体的细胞群体。疫苗是由非常复杂而又无法用化学方法合成的抗原混合而成的复合体。

当外源物质或微生物（抗原）进入脊椎动物体内时，身体将产生免疫反应，形成可分泌抗体的浆细胞（由B-淋巴细胞产生），分泌的抗体将以高度的特异性识别、中和和排除抗原。实际上，对某种特定抗原的抗体反应是高度异质性的。分离这些抗体实际上是不可能的。所以，传统的抗血

清由混合的抗体构成。然而，现在已经知道每种抗体都可以通过不同的B-淋巴细胞系和它们的衍生浆细胞产生。因此，只要能够克隆一种细胞系就能够只产生一种抗体。遗憾的是，浆细胞无法进行培养。1975年，Kohler和Milstein在他们的一个著名试验中证实：产生抗体的淋巴细胞可以与瘤细胞（细胞增殖力极强的骨髓瘤细胞）融合，产生的杂种骨髓瘤细胞即杂交瘤，可既表现出淋巴细胞所特有的产生抗体的特性，又表现出骨髓瘤细胞增殖力强的特性。因此产生了单克隆抗体。

制备单克隆抗体的方法是：将抗原注射到老鼠或兔子体内，取出脾脏，然后用骨髓瘤细胞与脾脏细胞融合（图7）。脾脏细胞中约有1%为分泌抗体的浆细胞，最后的杂交瘤中有10%为分泌抗体的细胞。每个杂交瘤细胞都能产生唯一的一种抗体，对它们可采用一定的选择技术加以鉴别，然后加以繁殖或克隆。由单克隆抗体杂交瘤细胞产生的克隆可以冷藏、可以注射到动物体内，也可以进行培养大量地产生抗体。这些克隆的细胞有许多在遗传上不稳定。虽然这些细胞在失去部分染色体后可以变得比较稳定，但失去的染色体常带有编码所需抗体的基因。

单克隆抗体用途很广，它可作为十分准确和灵敏的分析试剂用于肽、蛋白质和激素等药物的分析，还可作为许多医疗过程的诊断药，如检查输血用的血样中是否存在不合要求的因子。遗传操作与单克隆抗体技术的结合很可能开辟出一种能有效地生产病毒、细菌和寄生物抗体的新途径。单克隆抗体的其它重要用途将包括组织分型、体内肿瘤定位、临床诊断和治疗（包括化学治疗剂的定靶）等。

现在可以确信，融合技术不但能为原核生物和简单真核

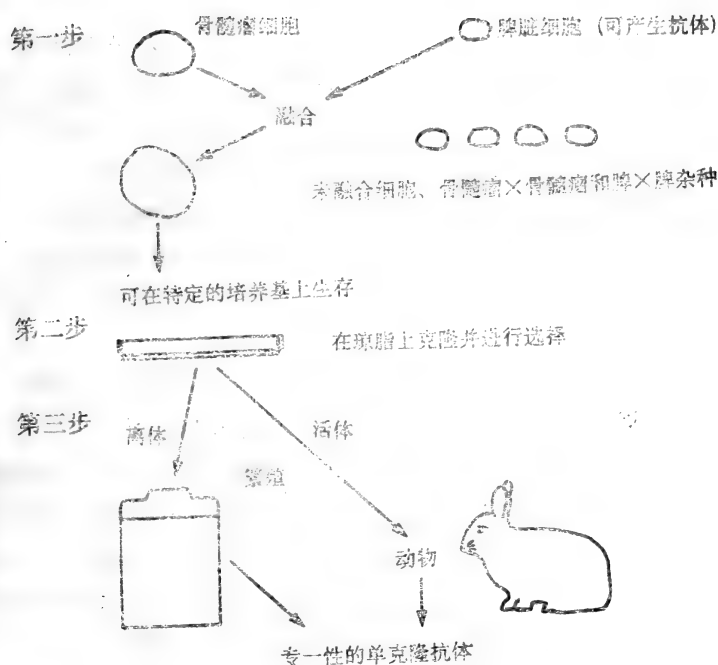


图7 通过细胞融合技术制备产生抗体的杂交瘤的过程示意图

生物（如酵母、线状真菌）在生物工程中的利用作出重大贡献，还将为正在进行的利用高等动植物组织培养开发新产品的过程作出大的贡献。

2.6 重组DNA技术

随着离体基因克隆技术的发展，在适当生物系统中，对

来自几乎所有有机体的所有DNA片断进行分离、纯化和选择性增殖已成为可能。因此，为遗传物质的分析与操作带来了革命性的变化。基因克隆时，由于删除了DNA中与目的基因无关的部分，分析与操作可以基本上对准感兴趣的基因区域，因此，所用方法的效率大有提高，而且也简化了对目前修饰后衍生物的鉴定与研究过程。当原生质体融合时，基因中的大部分或全部混到一起，而那些感兴趣的性状一般受很多基因所控制（如抗生素）。与原生质体融合技术相反，重组DNA技术一般只涉及与已知基因产物（如蛋白质、肽）有关的少数个别基因。

1978年遗传操作准则将遗传操作定义为：“利用各种手段从细胞中分离出核酸分子并将其通过病毒、细菌质粒或其它载体系统整合到原来不具有该核酸分子但允许该分子继续繁殖的寄主体内，最后形成遗传物质新组合的过程”。根据这一定义，遗传操作并不包括单克隆抗体的操作和用传统遗传技术进行的遗传改良以及体外受精和动物中使用的克隆技术等内容。迄今为止，遗传操作技术对生物工程研究与应用的贡献不大，但很重要。

近十年来，分子生物学的一些重要发现导致了DNA重组技术的迅速发展。特别重要性的发现包括：一种对于进入其细胞的外源DNA不产生降解或限制作用的大肠杆菌突变株的成功分离，以及能在特定位置打断双链DNA的限制性内切酶的发现与研究。一般说来，外源DNA片断本身不能在寄主细胞中产生转化作用和进行有效复制。这个问题主要通过DNA片断与载体的连接来解决。这些载体可以进入寄主细胞并使有关遗传信息得以表达。通常使用的载体包括细菌质粒、噬菌体和酵母2 μ DNA。DNA片断与载体在DNA连

接酶参与下形成共价键连接。这种新合成的载体（即嵌合的DNA分子）通过转化过程导入寄主体内（如大肠杆菌、枯草杆菌或啤酒酵母体内）。随着寄主细胞的生长与繁殖（克隆），载体也复制和增殖外源DNA。克隆整个基因组是可能的，它将产生出独立DNA分子的大集合，即基因组文库。基因组文库含有这种生物基因组的所有序列。原则上说，只要能够获得检测基因的探针，分离任何基因都应该是可能的。如果克隆的一个序列其平均大小为20kb，那么，要建立一个完整的人类基因组文库将需要大约700,000个单个的克隆。

遗传操作技术为人类提供了大变革的能力，因为这些技术见效快，可以普遍应用并且能够严格控制操作过程；更重要的是，可以创造以前用实验室方法从未筛选出的新遗传组合。重组DNA技术是当今生物科学中发展最迅速的领域之一。

“克隆”这个概念是重组DNA技术的核心部分。Timmis (1981) 将“克隆”定义为：“从相似成分的混合体中分离出能繁殖的单个成分，并将它们进行分别繁殖的过程”。实际上，克隆技术早已被人们用来通过营养方式繁殖病毒、微生物和植物的纯种，从而保证了这些生物基因组的准确连续性（表7）。现在，克隆这个词还包括单个自主遗传因子（如质粒和隐蔽性病毒基因组）的分离与保存。细胞生物的克隆只需要营养培养基；病毒和质粒的克隆则需要某种特定寄主细胞和营养培养基；而基因的克隆则需要某种载体复制子、特定的寄主细胞和营养培养基。各种类型生物的克隆技术在生物工程中均有其重要作用。因此生物工艺过程中使用的所有微生物、植物和动物细胞需要在纯和稳的状态下保存

与繁殖。病毒与质粒的繁殖或扩增更已成为崭新的生物工程的有力工具。

表7 克隆

基因源	典型生境	分离	生长培养基	扩增	要求
细菌	土壤	物理法，通过稀释，在固体培养基上进行	营养琼脂平板	工业细菌扩增形成菌落	营养培养基
病毒	污水	物理和生物学方法，通过稀释，用个别病毒颗粒感染敏感型宿主细胞	宿主细菌的纯培养物；营养琼脂平板	个别病毒在宿主的生长物上形成噬菌斑	宿主细菌；营养培养基
质粒	细菌的溶胞产物	物理和生物学方法，通过稀释，用个别分子转化感受态细胞	宿主细菌的纯培养物；含有质粒编码特性选择性因子的营养琼脂平板	个别质粒分子在个别形成菌落的细菌中扩增	宿主细菌；营养和选择培养基
基因·染色体		生物化学或物理学方法，将DNA打断成基因大小的片断并与质粒分子连接，然后转化感受态细胞	宿主细菌的纯培养物；含有质粒编码特性选择性因子的营养琼脂平板	个别质粒分子在个别形成菌落的细菌中扩增	克隆载体；适当的DNA片断形成方法；DNA连接酶；宿主细菌；营养与选择性培养基

• 本项参阅基因的高体克隆化内容。

关于基因克隆或重组DNA技术的原理，将主要以大肠杆菌K-12的质粒载体系统为例进行简单的讨论。虽然利用病毒载体进行基因克隆的技术在细节上有所不同，但涉及的原理是相似的。

图8和图9简要说明了外源DNA体外转移和在寄主细菌细胞中表达的基本要点。这些要点可概括如下：

(1) 分离环状质粒DNA分子。这种质粒DNA分子必

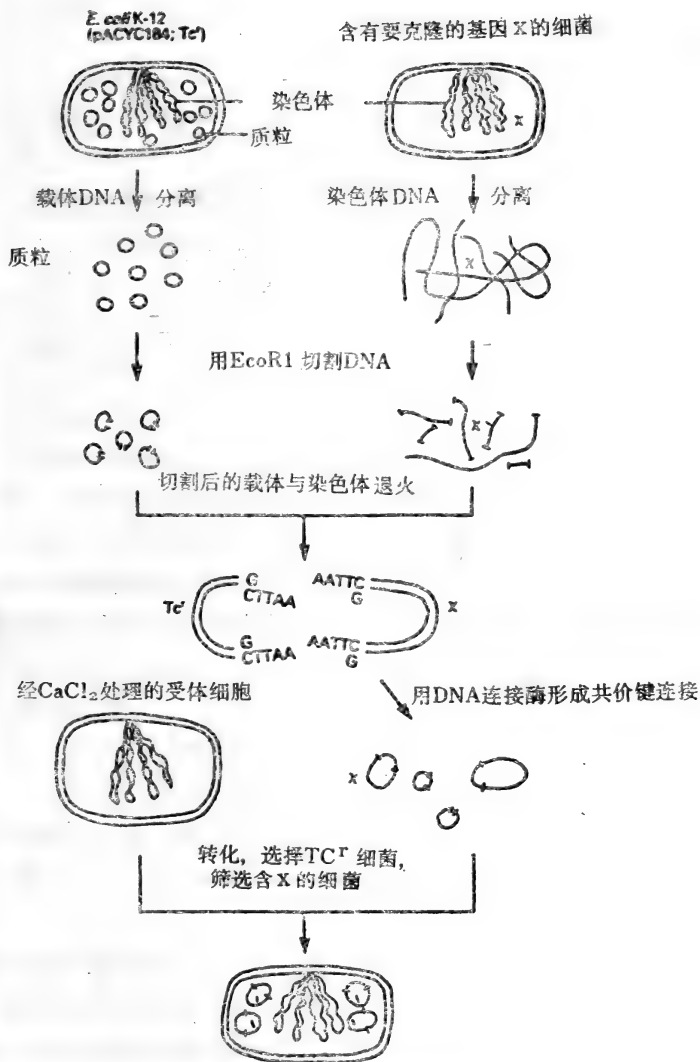


图8 基因克隆过程

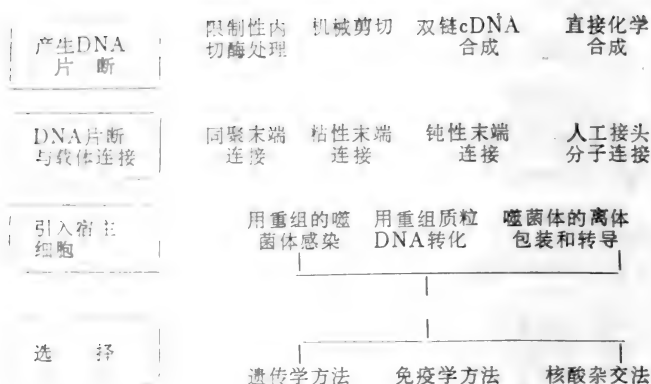


图9 克隆技术的策略

须具有一个被外源DNA整合后基本功能不遭破坏的位点。

(2) 用限制性内切酶产生适用于克隆的DNA片断。插入的DNA片断可以是另一种微生物(原核生物或真核生物),或动植物的染色体片断,也可以是某种化学合成的DNA序列。

(3) 将外源DNA与载体连接。

(4) 将杂种DNA重组体引入寄主细胞。

(5) 带有重组体质粒的转化子的表达。

由此可见,这项新的遗传技术的主要特点是可以在很大程度上对被克隆的DNA片断进行控制,并且基本上可用于任何生物的任何DNA片断。

2.6.1 质粒 对于重组DNA技术来说,质粒是它的基本组成部分。质粒基本上是独立于染色体并且能够稳定遗传的分子。它们在医学和农业方面很重要,因为它们赋予了人类和动物的病原菌以抗药性,并且可能带有为增加这种病原菌致

病力的毒素或其它蛋白质编码的序列；有的质粒与根瘤菌的固氮作用有关；有的带有与多种代谢活动有关的基因，使得某些细菌能够分解，可能成为环境污染物的化合物。质粒是双链的DNA分子，以共价闭合环状分子（CCC）形式存在于宿主细胞中。质粒的分子量约为 1×10^6 — 200×10^6 ，接性质粒可以将它们的拷贝由一个细菌转移到另一个细菌，并且可以在细菌间进行染色体DNA片断的转移。插入序列和转座子也可以由质粒携带。质粒可作为DNA克隆的载体。

带有抗药性基因的质粒叫抗性质粒（R-质粒）。某些大肠杆菌的R-质粒已经被用作质粒载体。克隆大肠杆菌基因时最常用的质粒是pBR₃₂₂，这种质粒可产生对氨苄青霉素和四环素的抗性。质粒DNA的分离可以通过溶解细菌细胞，然后用含有溴化乙锭的氯化铯梯度将质粒DNA与染色体DNA分开。

一些较小的质粒（如，Col E1）在宿主细胞中的拷贝数很多。因此，由质粒编码的产物可以被大量合成，因为每个细菌都含有许许多多的有关基因拷贝。如果用能选择性抑制染色体DNA复制的氯霉素处理细胞，可对质粒DNA进行进一步的选择性大量扩增。

pBR₃₂₂质粒含有与ColE1有关的pMB1质粒的复制子区即R1（Tn3）质粒的抗氨苄青霉素基因和pSC 101质粒的四环素基因。这两个基因可作为选择的标记。它起码含有10种内切酶的单一的点。

2.6.2 限制性内切酶 微生物能够识别自己的DNA与一些外源DNA。涉及能识别自己的和外来的DNA的这一系统依赖于细胞内的两种酶：甲基化酶和限制性内切酶。甲基化酶可以将甲基以特定的方式加到新生双链DNA的各种不同核

苷酸残基上。这种识别序列的长度通常为4—7个碱基对，并且是同文式的，即DNA双链中的一条单链的序列与其互补单链的序列是相同的。大多数生物具有若干自己特有的甲基化酶。限制性内切酶可识别与修饰酶同样的序列，但不是加甲基，而是在这一序列上切割DNA。不过，限制性内切酶不会切断“自己”的DNA序列，而是使“外源”DNA降解。这种对双链DNA特定序列的识别与断裂特性已经成为从大多数生物中切割DNA片断的基础。

限制性内切酶有不同类型（包括Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型），但只有Ⅱ型酶对新的DNA技术是重要的。

Ⅱ型限制性内切酶之所以特别重要，是因为它们具有序列特异性，并能在双链DNA的准确位置上将双链DNA打断。Ⅱ型酶以这种方式将长的外源DNA分子打断成较小的DNA片断，并且在质粒载体上打开一个缺口以便DNA片断可以从此插入。有的Ⅱ型酶可以在切断口处产生单链的末端，并且这些末端的碱基序列与该限制性内切酶产生的所有片断完全相同。这样，由特定限制性内切酶产生的任何片断，都可以与同种内切酶作用产生的任何其它片断进行碱基配对和退火，由此产生出杂种分子。由于现在有一系列的细菌可提供许多限制性内切酶，因此采用了标准命名方法。以*EcoRI*为例，它的第一个字母和其后的两个字母组成三个字母的缩写，并用斜体字母书写，分别表示生物的属和种，如，*E. coli*用*Eco*表示。非斜体的符号用来表示菌株或类型（*EcoR*），罗马数字表示内切酶号码（*EcoRI*）。

不同的限制性内切酶可用来产生不同大小的DNA片断，这些片断具有不同的3'-端或5'-端四核苷酸单链延伸端，并且可用电泳方法进行分离。

用 *EcoRI* 或其它在 pBR322 上具有单靶位的限制性内切酶将 pBR322 的一个靶位水解，便能将环状 DNA 转变为线状 DNA 分子。

大多数 I 型限制性内切酶识别的位点有一个两重的对称轴：它们可能是 4 个核苷酸，也可能是 5 个或 6 个核苷酸的序列。酶切割的 DNA 可产生钝性末端或粘性末端。粘性末端中，尾部为 3'-OH 基或 5'-单磷酸基的几个未配对的核苷酸从该末端伸出。许多最有用的限制性内切酶都能识别 4 个或 6 个核苷酸的回文式位点。例如，在 6 个碱基对序列中间进行切割的内切酶 *Hinc II* 可产生钝性末端的 DNA 分子，这种分子只能用 DNA 连接酶进行低效率地连接（图 10a）。*EcoRI* 以远离中心的部位打断识别位点（图 10b）。由于酶识别位点的回文性，形成的双链 DNA 分子将带有单链末端（即粘性末端）。如果将这些片断混合在一起，单链序列的互补碱基之间将形成氢键从而使末端相连。

平均每 4096 (4^6) 个碱基对可发生一个六核苷酸的特定序列。识别四核苷酸序列的内切酶产生的片断平均长度为 256 个碱基对。注意：编码一个分子量为 35000 的典型蛋白质所需 DNA 的量为 1000 个左右核苷酸。

用于克隆的 DNA 片断还可以用限制性内切酶以外的其它方法获得，如：机械剪切、声处理、化学合成或利用反转录酶以真核生物 mRNA 为模板合成“拷贝 DNA” (cDNA)。最后的这种方法克服了内含子或高等真核生物的大多数基因所特有的插入序列问题。当真核生物 DNA 在细菌中转录时，这种内含子不能被除去；但在真核生物中表达时，转录后带有内含子的前体 RNA 可在剪接加工时除去内含子。

2.6.3 连接到载体上 有几种方法可将 DNA 片断插入并连

接到质粒载体上。

用大肠杆菌或T₄噬菌体的DNA连接酶处理载体和DNA片断的混合物，可以在克隆载体与DNA分子之间形成共价连接。退火后，DNA片断之间将通过它们的粘性末端彼此形成共价磷酸二酯键。

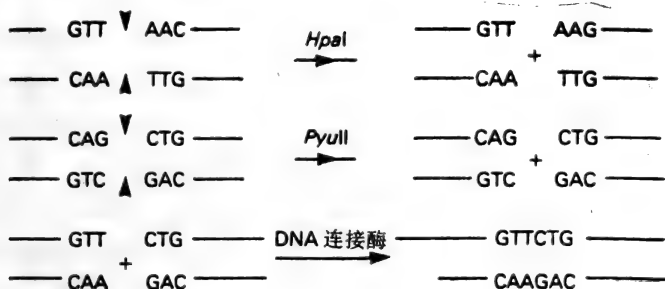
“钝性末端”（即“齐平末端”）的连接效率要低得多（图10a）。进行钝性末端的连接时，DNA分子不具有伸出的DNA单链，因此需要高浓度的DNA末端和酶才能实现有效连接。不过，这种方法可以大大增加可利用的内切酶范围，从而扩大了DNA研究的领域。钝性末端杂种一旦形成，便无法用产生原来那些DNA片断时使用过的任何内切酶将它们切开还原。

利用人工合成的具有一个或多个内切酶识别位点的寡聚核苷酸接头可以克服上述的潜在缺陷。现在可资利用的接头有许多，这些接头可以较容易地修饰DNA片断的末端。利用接头连接时，首先让接头的钝性末端与DNA片断连接，然后用适当的内切酶切割接头序列，形成必要的特殊末端（图10c）。用这种方法，较易于通过适当内切酶的作用，从重组体质粒上重新分离出克隆的DNA片断。

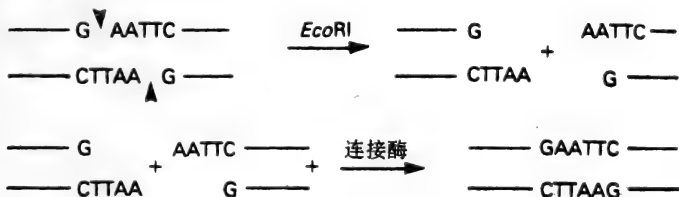
另一种较少使用的方法是，在载体的3'-端接上一个低聚鸟嘌呤核苷酸尾巴，并且在待插入的DNA片断的3'-端接上一个低聚胞嘧啶核苷酸尾巴。这样，载体和待插入的DNA片断便形成了可以互补的DNA单链伸展部分，它们通过碱基互补配对即可相互连接。这样形成的带有插入DNA片断的质粒新产物叫做质粒嵌合体。

2.6.4 转化 这项将DNA引入细菌的技术早已被人们所认识。该技术可以包括染色体DNA的转化，也可以包括质

(a) 钝性末端的切割与连接



(b) 粘性末端的切割与连接



(c) 用连接物连接非互补性末端

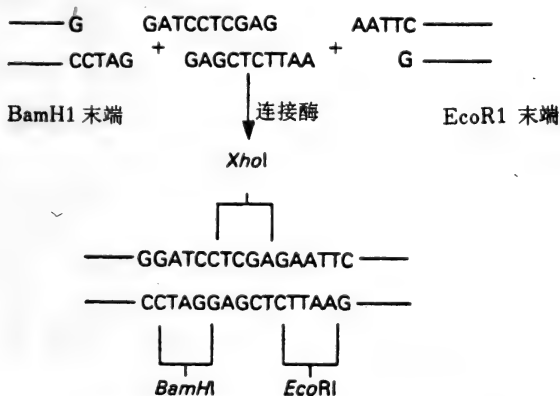


图10 限制酶与连接酶的作用模式

粒DNA的转化。如果是噬菌体DNA的转化则称之为转染。

在一个典型的质粒转化试验中，存在着许许多多相互混合的异质性DNA分子，其中只有少数的DNA分子是由一个载体分子与一个DNA片断相连组成。进行大肠杆菌转化时，首先用0.1M的冷氯化钙溶液处理大肠杆菌细胞，使之成为感受态，然后将这种感受态的细菌细胞与DNA分子相混合。混合后的细胞在37℃的温度下保温5分钟，以摄取转化DNA。之后，将这些细胞移到肉汤内，经过短期温育培养，这些细胞将表达出新获得的嵌合DNA的功能。通过特定的筛选过程可鉴定出带有杂种分子的细菌并使之纯化：分离和鉴别细菌的杂种质粒或分离和研究新的产物。转化效率为每毫克克隆的混合DNA中约出现 10^6 个转化子。

质粒载体正在被开发用于其它细菌，噬菌体载体和科斯质粒（由 λ 噬菌体粘性末端与正常质粒结合而成）也可以被使用。

革兰氏阴性细菌，特别是大肠杆菌已被广泛用于重组DNA过程。人们不得不研制专门的质粒载体用于革兰氏阴性细菌，特别是枯草杆菌和链霉菌。

目前，为了将重组DNA这项新的遗传工程技术转向真核生物系统，正在开展广泛的研究。酵母作为真核生物克隆的宿主是强有力的候选者。目前利用酵母菌的2 μ DNA和大肠杆菌的pBR322质粒合成的双功能质粒已经得到成功的发展与利用。在动物细胞中进行克隆，可以利用特殊的动物病毒（如猿猴病毒SV₄₀）的基因组来实现。在植物细胞方面，克隆技术尚未很好地建立，但致癌农杆菌Ti质粒看来是有用的。

重组DNA技术在高等植物育种中的应用潜力正在引起

人们越来越大的关注。这项技术使我们能够对有用植物进行直接的遗传改良，提高它们的生产力。到目前为止，在植物遗传工程中，新基因的功能表达还未见报道，其主要原因是植物中基因表达的分子基础还不够了解。而且，植物中大多数重要性状的基因还未加鉴定。在微生物遗传工程中，工程细胞的群体就是有用的终产物；而在植物中，如果遗传工程操作后的细胞不能再生为完整的植株则价值很少。遗憾的是，至今农业上的重要作物很少能够通过细胞培养再生出植株。通过遗传工程的方法进行作物改良，其潜力无疑是很大的。但是，在这种潜力成为现实之前，还需要在植物分子生物学的几乎所有领域作更多的基础性研究。

2.6.5 转化子的鉴定 在大多数克隆实验中，研究规划的主要部分是对转化后重组体克隆的鉴定。通常，结合到受体宿主中的转化DNA的数量要比宿主染色体的DNA少得多。因此，对转化片断表达的产物的鉴定是十分困难的。尽管如此，仍有一些方法能够用来鉴别携带有所需DNA序列的那些克隆。

(1) 互补：一些引进的基因可以与受体染色体上有缺陷的基因拷贝互补，也就是说，引进的这些基因，可以为一种正常的活性产物编码，而受体的这些基因正好是有缺陷的。例如，*lacZ*⁺基因（编码β-半乳糖苷酶）能互补受体的*lacZ*（β-半乳糖苷酶缺陷型），而使受体表现*lac*⁺，这样转化了的受体在MacConkey琼脂上表现为红色菌落，并可以被选出。

(2) 抗药性基因：这些基因可使通常为敏感性的细胞产生抵抗抗生素的能力。这一点可用pBR322质粒作具体说明。pBR322质粒带有抗四环素和氨苄青霉素的基因，其转化

子可用含有这两种抗生素之一的培养基选出：外源 DNA 通常被克隆到编码抗其它未选择的抗生素的基因中。

(3) 杂交：菌落或噬菌斑杂交是对一系列重组DNA分子或克隆细胞进行分析时广泛采用的方法。将含有重组DNA的细胞转移到硝酸纤维滤纸上并使细胞溶解，然后用经过放射性同位素标记的纯化的互补核酸分子与结合在硝酸纤维上的细胞DNA杂交。互补的DNA杂交后可通过放射自显影检出。杂交的程度将反映互补的程度。同样，结合在硝酸纤维滤纸上的重组体DNA也可用mRNA模板合成的拷贝DNA检出。

(4) 限制性内切酶分析：这种方法可用来确定克隆DNA是否产生与标准DNA同样大小的片断。限制性内切酶分析将提供图谱片断，这些片断常常是序列分析的先决条件。

(5) 免疫学方法：免疫学方法的应用在与日俱增。这种方法主要取决于抗体的开发（主要是蛋白质产物抗体的开发）。

重组体DNA的鉴定是工业克隆计划中高度保密的环节，大多数研究成果将仍然是特权信息。从这些新技术的商业重要性考虑，这是不可避免的，当然也是令人遗憾的。

近三十年来，应用遗传学发展很快，遗传工程必须恰当地看作是应用遗传学这一庞大网络结构的压顶石。尽管如此，遗传工程无疑是最激动人心的，并且从潜力上看遗传工程是可供工业遗传学家利用的最富有创造性的技术。

重组DNA技术在科学和经济上的应用是永无止境的。这些应用包括：

(1) 提高特定基因产物的产量。

(I) 提高特定终产物的合成速度：把另一些酶先克隆到生物体内或通过定点突变专一地改变某种已克隆的酶，如将大肠杆菌的贮能氮途径克隆到ICI单细胞蛋白生物甲烷同化菌中。

(II) “裁剪”生物：将特定性能转移到更合需要的宿主生物中。

在不远的将来，重组DNA技术将对医药产物产生重大影响。现在，已有可能将哺乳动物的基因转移到细菌中，并对这些基因编码的产物进行商业化生产，如具有特别重要性的化合物包括胰岛素、人的生长激素、酶、抗体、干扰素和疫苗等。随着重组DNA技术的开发与商业应用，这些产品中很多可望在八十年代末应市。在兽医方面，用遗传工程产生的动物新疫苗很快即将应市。虽然外源基因的克隆现在可用大肠杆菌常规地进行，但主要问题是大肠杆菌分泌的蛋白质种类很少。分泌性蛋白质的特点是具有信号序列，这种序列主要由决定蛋白质输出细胞膜的疏水氨基酸组成(Priest, 1984)。在输出过程中，信号肽被切除，产生蛋白质和激素。大肠杆菌的这一问题可通过将所需产物的基因与另一个基因产物可输出的外源基因结合而得到部分解决；另一种途径是增加细胞“漏性”。不过，其它细菌（如枯草杆菌）在外源基因克隆技术的工业应用方面肯定会找到更大的用途。枯草杆菌可分泌50多种蛋白质，它在遗传工程中的应用与日俱增。

从长远看，重组DNA技术应用潜力最大的领域是农业。目前正在积极研究将细菌的固氮基因转移到豆科植物以外的重要作物中；同样也正在研究将豆科植物控制与根瘤菌固氮联合的结构基因进行转移的可能性。

将来，由于应用遗传学家能够创造用于一定目的的“理想”生物，许多其它生物工程领域（包括能源、化学原料和废物处理）都将由此得益。

虽然现在可以对生物进行遗传操作的方法很多，但值得注意的是以下的技术障碍限制了它们在工业上的广泛应用。

(1) 工业上多数有用生物中，如产黄青霉和米曲霉，其有关目的基因在染色体上定位的信息很缺乏。

(2) 可供工业上多数重要生物利用的载体尚处于开发初期。

(3) 许多重要过程的生理机制，特别是催化重要转化过程的酶学步骤还不够了解。

(4) 涉及多基因的过程存在着难以克服的问题。

(5) 如果嵌合质粒稳定保持在细胞内，将只对宿主细胞有用。其危险不在于质粒会破裂，而在于经过几代连续培养后，质粒容易丧失。嵌合质粒的外加“遗传负荷”可能会影响宿主细胞的生长，所以没有嵌合质粒的细胞将过度生长，并取代其它细胞。但是，现在的许多研究表明通过嵌合质粒的改造或通过细心控制发酵参数，可以克服质粒的不稳定性。

2.7 重组DNA试验的准则与控制

重组DNA技术可产生自然界中前所未有的杂种DNA分子，从而引起了整个社会的普遍关注（表8）。工业上，利用这些新技术施行遗传操作已取得较快进展，目前正在广泛传播。这一技术的发展可转化为经济效益，其市场潜力可能会使人们忘却遗传工程对生态学和伦理学的深远影响。

表8 新生物工程商业化大事记*

1973	基因首次被克隆。
1974	来自不同物种的克隆基因首次在细菌中表达。 重组DNA (rDNA) 试验首次登上公共论坛 (Gordon 会议)。
1975	美国拟订出rDNA研究准则 (Asilomar会议)。
1976	美国首次建立rDNA技术开发公司 (Genetech公司)。 英国成立遗传操作顾问团。
1980	Diamond v. Chakrabarty—美国最高法院规定微生物可以在现行法律下取得专利权。Cohen/Boyer申请有关rDNA构建技术的专利获得批准。 英国制订生物工程规划 (Spinks报告) 联邦德国制订生物工程规划 (Leistungs计划) Genetech 公司首次股票交易创华尔街股份价格增长速度最快记录 (20分钟内由35美元上升为89美元)。
1981	单克隆抗体诊断盒首次获准在美国使用。 首批基因自动合成器上市。 日本制订生物工程规划 (国际贸易与技术部宣布1981年为“生物工程年”)。 法国制订生物工程规划 (Pellsolo报告)。 Hoescht**公司与麻省总医院签订协议。 Cetus公司首次公开集资 1.25亿美元, 创华尔街首次公开集资额最高记录。 工业生物工程协会 (IBA) 成立。 杜邦 (Du Pont) 公司拨款1.2亿美元用于生命科学的研究与发展。 本年底止, 已有80多个生物工程公司组成。
1982	rDNA动物疫苗 (用于大肠杆菌病) 首次获准在欧洲使用。 rDNA医药品 (人胰岛素) 首次获准在美国和英国使用。 为建立临床试验基金成立了第一个研究与发展两合公司 (R & D limited partnership)。

-
- 1983 植物基因首次在不同物种的植物中表达。
 生物工程公司在美国公共市场筹集资金5亿美元。
-

- 本表来源:技术评估办公室 (Office of Technology Assessment)。
- • 原文误写成Hoesch公司,实系德国Hoechst公司之误。德国Hoechst医药公司1981年5月14日和麻省总医院签订了一项在后者建立分子生物学系的协议,根据协议Hoechst公司将在10年内向麻省总医院提供7000万美元的资助。——译者注

起初,涉足遗传工程的国家所制订的最初条例是很严格的,而现在这些条例已放松到很少顾及的地步。虽然早期对遗传操作危险性的担心有些过份,但保持持久的警惕却是必要的。

培育用于生物工程过程的新菌株常常花费极大。由于这个原因,大多数生产企业对重要生产菌株都防范很严。现在活的生物虽然可以在很多国家申请专利,但这种专利究竟能起多大的保护作用是非常值得怀疑的。关于以专利程序为目的对微生物保存获取国际承认的布达佩斯条约(1978)。对在条约上签字的国家的现行做法做了法律规定,并且允许通过发放专利对已传给保存者的微生物给予国际承认。这一条例会取得多大成功还很难说。

本章提要

应用遗传学是关于获得新的和改良的生物品系并用之造福于人类的科学。在生物工程中,它将包括对来自自然界、培养物收集中心和其它组织的生物进行选择,或对“室内”

-
- 该条约英文名为: The Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the purpose of Patent Procedure (1978)。

菌株作进一步开发利用。许多技术可用于修饰和增删生物基因组。在生物工程规划中，选择和筛选占主要部分。筛选是指利用一定方法从一大群体中鉴别和分离所需生物或代谢物的过程。筛选可以是非选择性的随机筛选，即针对所需品质对所有分离物分别进行处理；也可以是包括一些预选环节的理性筛选。

产生菌的保藏必须尽量减少遗传性能的退化。菌种保藏可以在琼脂培养基上进行，也可以通过减少代谢，如干燥、冷冻干燥或超低温方式进行。

诱变和各种杂交方式均可改变生物的基因组。诱变计划主要用于菌株改良。可用的诱变剂包括紫外线、电离辐射、胸腺嘧啶饥饿和各种化学诱变剂。生物的突变率受遗传控制，并且可以被增变基因和反增变基因改变。

从实质上看，杂交是一种促进生物间遗传物质重组的方法。杂交有有性和准性两种方式。有性杂交发生在单倍体核之间，它包括核配、核融合和最后进行减数分裂。由于染色体的重排与重组，遗传性状将发生重组。

准性过程利用各种细胞机制将不同遗传来源的遗传物质带到一起。工业上采用的主要方法包括：接合、转导、转化和有丝分裂重组。

原生质体融合技术被广泛用于微生物细胞以及植物和动物细胞。由于融合促进剂聚乙二醇的使用，融合频率已大大提高。

重组DNA技术可以对来自几乎所有生物的DNA片断或基因进行分离、纯化和在特定的宿主细胞中进行选择性扩增。这一技术的基本工具是限制性内切酶，这种酶能在特定的位点切断双链DNA，产生特定大小的DNA片断。这些片断然

后可插入质粒或噬菌体等载体中,并通过DNA连接酶形成共价键连接。转化是将这些嵌合体 DNA 分子引入宿主细胞的主要方法。宿主细胞类型一般为大肠杆菌、枯草杆菌或啤酒酵母的特定突变体细胞,但也有例外的情况。转化细胞可用以下几种方法鉴别:互补法、抗性标记法、杂交法、免疫学方法和限制性内切酶分析法。

第三章 发 酵 工 程

3.1 发酵工程的性质

发酵工程的兴起主要与微生物在食品和饮料生产中的应用有关。这些应用包括乳酪、酸奶、酒精饮料、醋、腌菜、泡菜、香肠、酱油和东方国家的其它许多发酵品(表9)。目前这些产品的大规模生产基本上是过去家庭技艺形式的放

表9 发酵产品(按产业部门划分)

部 门	产品或活动
化学	
大量生产的有机物:	乙醇、丙酮、丁二醇、有机酸(柠檬酸、衣康酸)
小量生产的有机物:	酶、香料、多聚物(主要有多糖)
无机物:	金属回收、生物累积与浸滤(Cu、U)
医药	抗生素、诊断剂(酶、单克隆抗体)、酶抑制剂、类固醇、疫苗
能源	酒精(汽油酒精)、甲烷(沼气)、生物量
食品	乳品(乳酪、酸奶)、鱼肉制品、饮料(酒精饮料、茶和咖啡)、面包酵母、食品添加剂(抗氧化剂、色素、调味剂、稳定剂)、新颖食品(酱油、印尼香蕉豆、日本豆酱)、蘑菇制品、氨基酸、维生素、淀粉制品、葡萄糖和高果糖浆、蛋白质及果胶质的功能修饰物
农业	动物饲料(SCP)、兽用疫苗、青贮与堆肥、微生物杀虫剂、根瘤菌与其它固氮菌的接种物、菌根接种物、植物细胞和组织的培养(营养体繁殖、胚生产、遗传改良)

天。与此同时，人们也相应地认识了微生物在消除令人讨厌的废物方面的作用。在这一认识的基础上，水的净化、污水处理和废物处理等世界范围的大型服务性工业便应运而生。

人们利用这些微生物的能力还开拓了许多新的发酵工程领域，其中包括（1）大量生产特定的基本初级代谢产物，如，甘油、醋酸、乳酸、丙酮、丁醇、丁二醇、有机酸、氨基酸、维生素、多糖和黄原等；（2）生产有用的次级代谢产物（它们对产生菌本身的生活似乎看不出有直接的作用），如，青霉素、链霉素、土霉素、头孢霉素、赤霉素、生物碱、放线菌素等；（3）生产工业上需要的产品——酶制剂，包括胞外酶（如，淀粉酶、蛋白酶、果胶酶等）和胞内酶（如，蔗糖酶、天冬酰胺酶、尿氧化酶、限制性内切酶、DNA 连接酶等）。最近，发酵工程上已开始细胞或组织培养的条件下对高等动、植物的细胞加以利用。植物细胞培养主要用来生产次级代谢产物（如，生物碱、香料、调味品等），而动物细胞培养一开始则主要与蛋白质类分子的生产有关（如生产干扰素、单克隆抗体和许多其它蛋白质）。

发酵产品将大量供应未来的市场，因为在绝大多数情况下，用其它化学方法无法经济地生产出这些产品。发酵生产的经济价值还将通过创造前所未有的高生产率遗传工程生物而得到进一步改善。发酵工程产品的商业市场可以说是无限广阔的，但最终将有赖于经济和安全方面的考虑。

虽然商业发酵过程中所使用的生物、培养基和形成的产物不尽相同，但这些过程在本质上是相似的。在所有情况下，具有一致特性的微生物是在特定的控制条件下进行培养。同样的设备稍作修改就能用来生产酶、抗生素、有机药物或单细胞蛋白。最简单的发酵过程只需将微生物和营养液简单混

合便能使其组分相互作用。比较先进和精密的大规模发酵过程,则需要对整个环境加以控制以保证发酵过程有效地进行,更重要的是要确保用同等量的原料、培养液和细胞接种物能精确地重复产生相同数量的产品。

所有生物工程过程都是在容器系统(生物反应器)中进行的。三十多年来,大多数普通生物反应器在物理造型上变化不大。不过,最近设计了一批新型的生物反应器,它们在生物工程中可能会产生越来越积极的作用。生物反应器的主要作用是使产品生产或服务的成本降到最低。正是由于需要提高产品形成速度和产品(或服务)的质量,生物反应器在设计和功能上才得以不断完善。研究者们必须考虑改善无菌设计与操作,提高生产过程的控制能力(包括利用计算机),并且考虑如何更好地了解一个系统的限速步骤,特别是热和质量传递过程。

在生物工程中,生产过程可以大致划分为成本密集的转化过程和成本密集的回收过程。对于成本密集的转化过程来说,单位容量生产率 Q_v (公斤产品/米³/小时)是最重要的指标;对于成本密集的回收过程来说,则产品浓度 P (公斤/米³)是成本最低化的主要指标。表10列出了生物化学加工工业用生物反应器生产的各类产品,表11说明了生物工程中所使用的各种培养方法。

生物工程过程中使用的生物反应器有三种主要操作型,使用的催化剂有两种形式。反应器的运行方式有分批、半连续(喂料分批)和连续三种。发酵反应可以在静态或搅拌的培养物中进行,可以在有氧或无氧、液态或低水分(固体底物发酵)条件下进行。生物催化剂有的是游离态,有的通过固定化过程或自然粘接过程粘附在物体表面。生物催化剂可

表10 生物工程工业中不同范畴的产品举例

产 品 范 畴	举 例
细胞生物量*	面包酵母、单细胞蛋白
细胞组分**	细胞内蛋白质
生物合成物**	抗生素、维生素、氨基酸和有机酸
分解代谢物*	乙醇、甲烷、乳酸
生物转化物*	玉米高果糖浆、6-氨基青霉烷酸
废物处理物	活性污泥、厌氧消化作用

* 典型的成本密集的原料转化过程。

** 典型的成本密集的回收过程。

表11 培养方法的特点

培养方式	操作特点	应用
固体培养	操作简单,成本低,单细胞菌落的选择切实可行,但操作过程的控制较困难	菌种保存、遗传研究、酶生产、堆肥等
膜培养	生物反应器型式多样:滴滤式、转盘式、填充床式、海绵式反应器、转管式(见第四章)	废水处理、单层培养(动物细胞)、细菌浸滤、造醋等
细胞均匀分布的深层培养	“自发”反应、反应器型式多样:连续搅拌罐反应器、气升式、环流式、深井式等,搅拌通过搅拌器、空气、液体进行,物理参数的过程控制切实可行,但化学和生物学参数的控制较差	标准型式的培养;抗生素、溶剂、酸等
喂料分批式培养	是控制调节效应(如葡萄糖阻遏)的简易方法	面包酵母的生产
匀质的一步性连续培养	可较好地控制反应,是研究动力学和调节机制的有力工具;但试验成本高,存在无菌操作问题,需要训练有素的操作者进行操作	工业规模应用的例子很少,只有单细胞蛋白生产和废水处理等

以是正在生长的细胞，也可以是非生长状态的细胞，还可以是离体的酶。它们均可作为可溶性的或固定化的生物催化剂加以利用。生物反应器中进行的反应，一般是在接近中性的pH值和温度为20~65℃的温和条件下进行。大多数生物反应器的这些过程都在液相中进行，它们流出的产物比较稀。

生物反应器过程的优化包括使用原材料（如养料、前体物质、酸或碱、空气）和能量（1978年以来能量成本每年递升16%）的用量最少，而产品纯度和回收前培养液的质量最高。过程优化可以通过控制与该过程有关的物理和化学参数来实现。表12列出了与生产过程密切相关的一些重要变量，后面将予以讨论。

表12 发酵过程中的工艺变量

温度	pH值	呼吸商
压力	氧化还原电位	细胞浓度
搅拌速度	溶解氧	细胞组成（蛋
输入功率	溶解的CO ₂	白质、DNA、
气流速率	流出物含氧量	RNA、脂肪和
养分、前体和诱	流出物CO ₂ 含量	碳水化合物）
导体加入速率	碳水化合物、	酶的特异性活性
发酵液重量	氮、矿物离子、	产物形成、
液体体积	前体、诱导物、	生物生长、
粘度（表现的）	产物和代谢物	摄氧、前体
酸、碱及防	的溶解量	利用、养分
沫剂的累积量	发酵液的流变	吸收和CO ₂ 产
	学特性	生的比速
	功率特性	传氧速率
	能量平衡	

本章的其余部分将讨论有机体在生物反应器中生长的原

理，特别要提到用于产品生产的微生物、植物和动物细胞。关于生物反应器在酶功能方面的应用，包括可溶性酶、固定化酶以及某些类型的固定化微生物细胞系统等内容将在第四章中加以讨论。

3.2 液态系统中微生物培养的原理

生物的生长可以看成是用质量或细胞数表示的细胞物质的增加，它是一系列高度协调的酶促生物学步骤。只有必需养分能够有效地输送到细胞表面（质量传递），并且环境参数（例如温度和 pH 值等）保持在最佳水平才能获得最佳生长。

生物反应器中细胞物质（生物量）的数量（ X ）可以用重量表示（加干重或湿重，DNA 或蛋白质重量），也可以用数量表示（细胞数）。加倍时间（ t_d ）指生物量的重量增加一倍需要的时间。世代时间（ g ）指细胞数量增加一倍需要的时间。在平衡或指数生长期，当生长只受细胞的内部活动支配时，只要群体中的每个细胞都能分裂，则 $g=t_d$ 。随着细胞体积和复杂性的增加，平均加倍时间随之增加。下面是实验获得的数值范围（小时）：细菌 0.25~1，酵母 1.15~2，霉菌 2~6.9，植物细胞 20~40。

在理想的条件下，微生物生物合成的潜力是很大的，有的细菌生物量加倍时间只要 15 分钟。然而，任何时候生长条件都处于最佳状态的情况是很少见的。实际上细胞的生长将变成有赖于某种限制因子（如必需的养分）。当限制因子的浓度下降为零时，生物的生长潜力随之减少为零。Monod（1942 年）的经典研究发展了用来描述生物反应器中微生物

生长基本特性的数学方程。原来的数学方程表示了浓度 S 与生长比速 μ 的函数：

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

上式中， S 是培养基中与其它必需养分相比处于限制性浓度的底物浓度， μ_{\max} 是生物的最大生长比速， K_s 为饱和常数。 K_s 是 $\mu = \mu_{\max}/2$ 时的底物浓度。如果底物浓度可以稳定保持在适当数值（这一点对连续培养是重要的），在 $0 \sim \mu_{\max}$ 之间的任何生长比速下均可出现指数生长。生长必需的养分和生长需要的最佳条件的鉴定来自分批和连续式生物反应器系统。生长速度指生物体浓度增加的速度 (dx/dt)，而生长比速则指生物体单位浓度的增加速度 ($1/x$) (dx/dt)。生长与底物利用之间存在着简单的关系。在简单系统中，生长速度是底物利用速度的常数部分 (Y)：

$$\frac{dx}{dt} = Y \frac{ds}{dt} \quad (2)$$

Y 是产量常数。在任何有限的生长期间均有：

$$Y = \frac{\text{形成的细胞重量}}{\text{消耗的底物重量}}$$

知道了三个生长常数 (μ_{\max} , K_s 和 Y) 的大小，即可由方程 (1) 和 (2) 对分批培养的生长周期进行全面的定量描述。

分批培养时，生长所需要的接种物和营养物在最适的温度和 pH 条件下一同装到一个容器中，进行混合。除非好气性生物通常需要向反应器连续充气外，分批培养实际上是一个封闭的系统。

在分批培养中，生长速度与生长比速很难稳定，这反映了该系统营养环境不断改变的特点。图11表示微生物分批培养

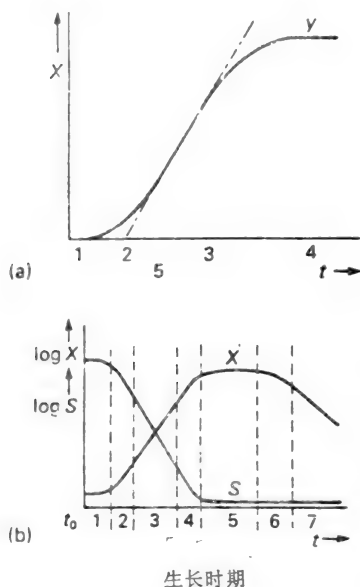


图11 微生物分批培养的生长特性

(a) 以生物量浓度(或质量) X 作为时间 t 的函数: 1. 延滞期, mRNA和酶合成, 生物量的生产与破坏相抵消, 净生长量为零 ($\mu=0$)。2. 指数生长期, $\mu=\mu_{max}$ 。3. 减速期的中心部分。4. 净生长等于零, $\mu_0=0$ 。5. 变量 μ 值的跨度为: $\mu_{max} \rightarrow \mu_{max} \rightarrow 0$ 。(b) X (生物量) 和 S (基质, 如葡萄糖) 质量的浓度对数值与时间的半对数图 (t 尺度为线性): 1. 延滞期, $\mu=0$ 。2. 加速期。3. 指数期, $\mu=\mu_{max}$ 。4. 减速期。5. 稳定期, $\mu=0$ (参照图11a)。6. 衰退期。7. 死亡期。

养的复杂性。开始的延滞期看不见菌体生长, 但化学分析表明该时期发生着内在的代谢变化, 这表明细胞正在适应新的环

境，并且将在适当的时候开始生长。现在认为接种物的生理状态不仅是影响延滞期长短的主要因素，而且会影响到将来的菌体生长与产品形成（如抗生素合成）。在接种物长出之后和指数生长开始之前有一个瞬间加速期。由于这个时期的细胞群体在年龄结构与代谢方面的异质性，目前对该时期在生理和数学上都还不太了解。在指数生长期，如果营养素丰盛，且也不存在抑制因子，则生物体将无休止地生长，生长比速将达到最大值，即 $\mu = \mu_{m,x}$ 。但是，在大多数分批培养过程中，指数生长是短暂的。随着养分被生长的细胞群体耗尽，无限生长将被有限生长取代。这时，虽然细胞群体仍在扩大，但任何特定点上的生长比速往往会变得越来越小，即 $\mu < \mu_{m,x}$ 。这段时期叫减速期。减速期以后为稳定期。稳定期中，由于养分被耗尽，整个生长可能停止。此时，由于

生长速度 = 死亡速度

生物量将达到平衡。许多生物工程产品（如抗生素）都是在这段生长周期内达到最佳状态。生长周期的最后阶段为衰亡期，此时生长比速为负值（ $\mu < 0$ ）。由于代谢减少和细胞解体，生物工程的大多数分步过程都在进入这个时期以前被中止。

实际上，分批培养已被用于优化生物体或生物量的生产，并继而进行特定的化学转化过程，如终产品（抗生素、有机酸的）形成或物质降解（污水处理）。许多重要产品都是在分批培养生长周期的稳定期内获得最佳。

与分批培养不同，连续培养时，养料的加入与在总培养物体积中取出比例相等的一部份，是不断地进行的。连续培养法可以使生物在稳定状态的条件下生长，即以恒定的速度和在恒定的环境下进行生长。在分批培养物的生长周期中，

pH、养分浓度和代谢产物浓度不可避免地发生着变化，而在连续培养时却可以保持恒定。实际上，实验人员可以通过对这些参数的分别控制了解到每种因子对生物生长的作用。

在完全混合的连续培养系统中，将灭过菌的培养基以稳定的流速（ f ）输入生物反应器，并且以同样的速度输出发酵液，使容器内培养物的体积（ V ）保持不变。经过有效地混合，流入的培养基将迅速均匀地在整个生物反应器中扩散。通过建立细胞、基质、产物等的平衡方程式可以对所有搅拌式连续反应器系统的特点在数学上加以描述。其中，任何组分浓度变化的净速度等于所有增加和减少这一组分的过程的速度之和。实际上，这些过程可能包括（a）因流入反应器使组分增加——它等于流入速度乘以流入组分的浓度，（b）因流出使组分减少，（c）因生长而（细胞）增加，（d）因利用而底物减少，（e）产品形成和生物量增加。

在连续的生物反应器中，保留时间不是由流速和培养物体积的绝对值表示，而是用它们的比值——稀释率 D 来确定，这里 $D=f/v$ ，即每小时完全体积的变化数。一个颗粒在培养物容器中的平均保留时间等于 $1/D$ 。假如是完全均匀一致的混合，生物反应器中的每个细胞将有同样离开反应器的机率，即在一定的时间内被冲出。

生物体的净增数量可以用简单的方程表示：增加量 = 生长量 - 输出量

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx$$

当 $\mu > D$ 时， dx/dt 为正值；细胞浓度将增加；当 $\mu < D$ 时， dx/dt 为负值，将发生细胞冲出；当 $\mu = 0$ 时， $dx/dt = 0$ 并且 x 为常数。在这种情况下，将达到稳定状态，以致生物

体浓度将不随时间而改变。

稀释率还影响着生物反应器中底物的浓度。反应器中，以浓度 S_R 加入的底物被生物体消耗后以浓度 S 流出，底物浓度变化的净速度为

$$\begin{aligned}\text{增加量} &= \text{输入量} - \text{输出量} - \text{消耗量} \\ &= \text{输入量} - \text{输出量} - \frac{\text{生长量}}{\text{产量常数}}\end{aligned}$$

$$\frac{ds}{dt} = DS_R - Ds - \frac{\mu x}{Y}$$

当稀释率超过 μ_{max} 值时，将发生生物体冲出。

如果将一个连续培养系统看作一个生产系统（如SCP生产过程），其性能可由两个指标来判断：（1）单位时间内产生的细胞数——输出速度；（2）单位重量底物产生的细胞数——有效产量或“产量系数”。在稳定状态下，总输出量等于流速与生物体浓度的乘积。要获得细胞或生物量的最高输出，应该有高的稀释率，但显然不能超过 μ_{max} 。实际上可以用最高输出速度或略低于最高输出速度的流速与切实可行的最高底物浓度来获得既有高输出又能有效利用底物的最高生产效率。这种最佳条件只与生物量的产生有关。有的发酵产品（如酒精）的形成与底物消耗量成比例，它们可以采用相似的条件，但对于复杂代谢产物（如抗生素）的生产可能需要完全不同的条件。

喂料分批培养是另一种培养方式，它将培养基或底物连续或相继加入起始的一批原料中而不从系统中取出任何产品。这种系统的产品产量很可能超过传统的分批培养。这种方法在工业上（如面包酵母的培养中）已被广泛采用。

分批培养，喂料分批培养和连续培养系统均已在生物量或细胞产品生产中得到应用。由于种种原因，分批培养技术仍然是工业实践中的优势类型。要更深入了解生长生物体的各种技术动力学请参阅Pirt (1975) 和 Fiechter (1981) 的著述。

3.3 生物反应器的设计

生物反应器是生物工程过程进行生物学反应的容器系统。它可为最佳的生物生长与代谢活动提供适宜的环境；它能防止环境对生产培养物的污染，同时也能防止培养物释放到环境中。它装有相关的仪器或探针，能够进行最佳的过程控制（表13）。

表13 生物反应器设计的基本考虑

-
1. 细胞系统（微生物、哺乳动物或植物细胞系统）的微生物学和生物化学特性
 2. 生物反应器的流体力学特性
 3. 生物反应器的质量和热量特性
 4. 细胞生长与产物形成的动力学特性
 5. 细胞系统的遗传稳定性
 6. 无菌设备的设计
 7. 生物反应器环境（包括大环境和小环境）的控制
 8. 生物反应器的设计对发酵产物分离过程的影响
 9. 生物反应器的成本与操作费用
 10. 生物反应器的放大能力
-

许多生物反应器系统要求在无菌条件下运行。在大多数重要的工业系统中，生产用的生物体均采用纯培养物。外来杂菌对生产过程的影响是多方面的，其中包括干扰生物催化

剂，破坏产品，产生可能妨碍产物提取与纯化过程的物质，或将有毒的分子带进系统。

为了避免这些问题发生，必须对培养基、生物反应器和所有附属管道系统进行灭菌（通常用高压蒸气进行），所有进入系统的空气，必须经过灭菌的玻璃棉以排除污染物。分批发酵的培养基一般在反应器内灭菌，而连续系统则采用外部灭菌。发酵工业中，污染菌偶尔会进入生物反应器并造成危害。因此，为了防止污染造成太大损失，抗生素工业的反应器很少大于 200m^3 。连续发酵过程更有必要采取严格灭菌操作。据估计，遗传工程微生物将大量用于工业生产，这样将需要使用更加昂贵的杂菌防除技术。

好气过程的设计必须包括使空气纳入和使内含物混合的机构，并且对所有系统都必须考虑接种与取样，装料与取料的需要。搅拌、通气和代谢的氧化过程产生的能量输入必须通过冷却装置排除。能量输入量的检测对于确定总的混合与通气速度是必要的。

反应器的构成材料应该是无毒的，并且能经受蒸气压力和抵抗化学与电溶解的侵蚀。生物反应器通常用高度磨光的不锈钢材料制成。生物反应器形状和体积各异，高度与直径的比值（特征比）是它们的重要工作参数。

工业生物反应器的体积受所需产品浓度和采用分批还是连续操作影响。虽然连续培养技术被广泛用于研究，但在工业方面的应用却很有限，工业应用的例子有SCP和酒精生产过程以及废水处理。几乎所有的其它工业过程都采用分批培养或喂料分批培养方法。

工业上分批培养和喂料，分批技术之所以占优势是由于下面的一些（或全部）原因：

- (a) 特定时间内对产品需求量可能很少；
- (b) 市场需求可能是周期性的；
- (c) 特定产品的货架时间很短；
- (d) 为了便于产物分离与纯化，要求发酵液中的产物有较高浓度；
- (e) 特定产物只在生长周期的稳定期产生；
- (f) 一些生产菌株不稳定，需要定期更新；
- (g) 连续生产仍有许多技术上的困难。

工业生物反应器虽然品种繁多，但目前使用最广的类型仍然是早期使用过的连续搅拌罐式反应器（CSTR）（图12a）。在没有机械搅拌的生物反应器中（如塔式和环流式生物反应器），搅拌是借很高的气体冲力进行的（图12b）。现在普遍认为，处理液体发酵液的大型生物反应器，采用这种设计可以与机械搅拌式生物反应器在经济上展开竞争。但是，在所有系统中，粘滞度的增加可能给通气带来严重困难，因为小气泡合并成大气泡会减少界面的面积。

一般说来，发酵工业需要一种能满足多种不同运转条件（包括粘滞度的变化，通气速度，搅拌强度和发酵体积）的生物反应器。实际上CSTR已经被广泛接受。在选用生物反应器时还要考虑到在同一工厂加工不同产品，因此要求发酵系统容易改装和灵活性大。

CSTR的基本设计是在四十年代和五十年代期间提出的。在此期间，它被用于青霉素的工业生产。CSTR一般为充分密封的直立式圆柱体，面板厚度为罐体直径的10%（图12a）。灭菌后的空气通过一个开口的管子或环形喷头从容器基部进入反应器。顶部带有传动装置的垂直转轴装有一个或多个搅拌器（取决于特征比）。通常搅拌器安装在转轴上，

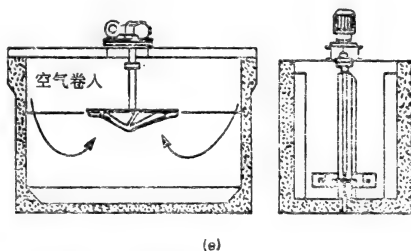
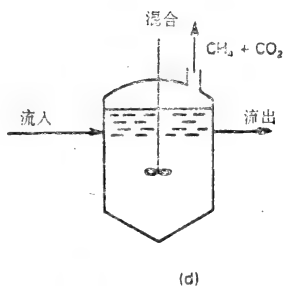
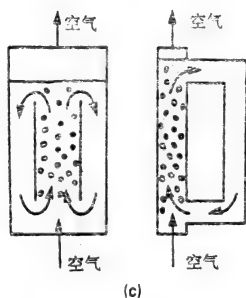
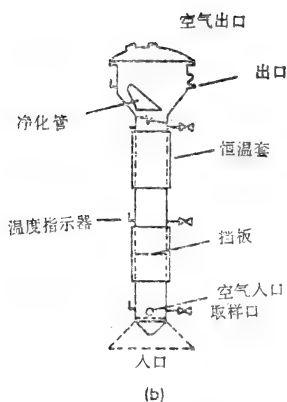
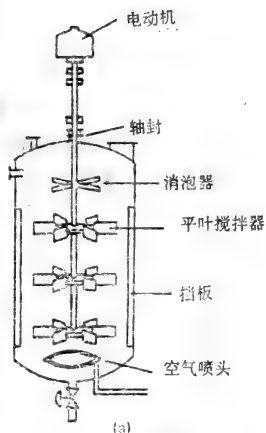


图12. 各种形式的生物反应器

(a) 连续搅拌罐式反应器 (b) 塔式反应器 (c) 环流式(循环式)生物反应器 (d) 厌氧消化器或厌氧生物反应器 (e) 活性污泥生物反应器。

相互间距等于罐子的直径，以免液体呈旋涡式运动。大多数生物反应器采用叶片扁平的涡轮式搅拌器。通常安装3—5个这样的涡轮式搅拌器即可在整个系统的高度内达到充分混合与扩散（图12a）。这种涡轮搅拌系统要求的功率输入很高。为了寻找更有效的设计，人们对此进行了许多研究。典型的工业CSTR系统如图13所示。

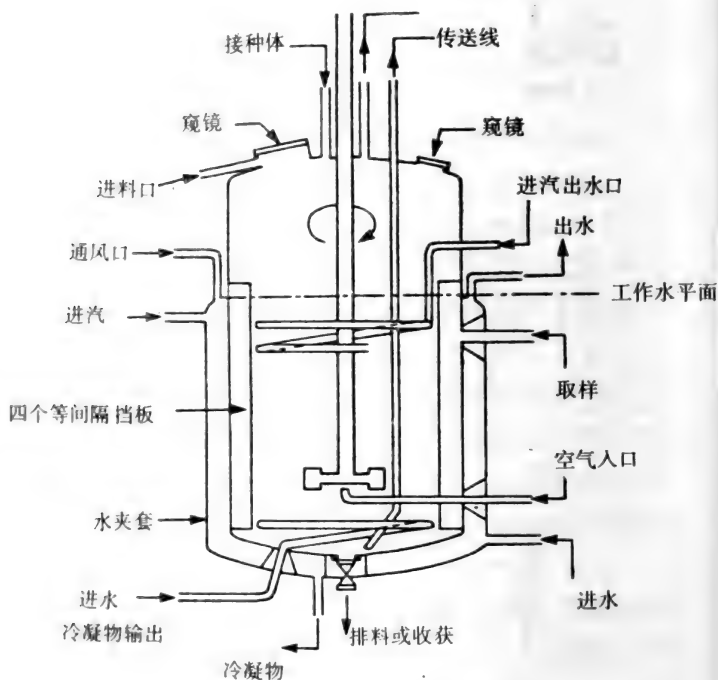


图13 工业用的连续搅拌罐反应器

搅拌器的作用是在生物反应器内进行搅拌与混和并促进通风（图14）。搅拌与通风在CSTR操作成本中占可观部分。

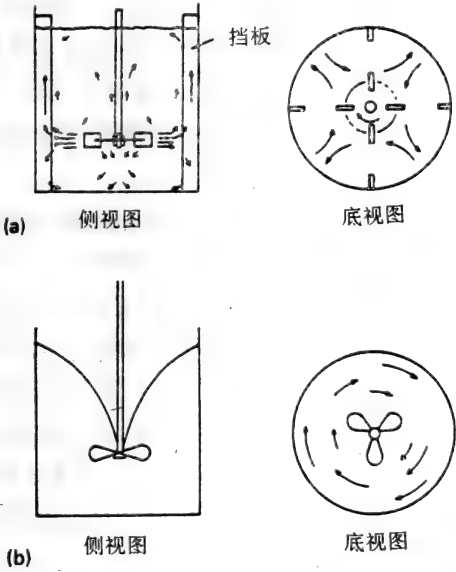


图14 生物反应器的混合作用类型

(a)有挡板式反应器的辐射类型 (b)无挡板式类型

搅拌的作用主要是使细胞与养分能在整个培养基内均匀分布，使养分（包括氧气）能够供细胞使用并且促进热的传递。生物体非常需要氧气。由于氧气在液体的溶液中溶解量很少，发酵过程只能通过对发酵液进行强有力的搅拌和通风来维持。搅拌对氧气传递系数 (K_La) 的影响有三种方式：

- (1) 搅拌器将空气分散为较小的气泡从而增加了气液界面面积。
- (2) 搅拌可以延缓空气从生物反应器中损失。
- (3)

激烈的搅切可减少气液界面膜的厚度。

塔式反应器可定义为伸长的管状容器,其特征比大于6:1(图12b)。塔式反应器没有机械搅拌装置,空气从塔底进入反应器,通过气泡上升过程达到混和目的。因此几乎没有对生物造成剪切效应。环流式(循环式)反应器采用强迫和控制液体定向流动的设计(图12c)。通过采用通风管或折流管产生液体内循环,或通过利用循环管进行外循环实现了这个目的。

日常有大量来自生活和工业的有机废水要通过厌气和好气的生物反应器系统加以处理。在没有游离氧存在的情况下,某些特异性微生物能将可进行生物降解的有机物转化为甲烷, CO_2 和新的微生物细胞。原始有机物中化学固定的能量被用于新微生物细胞。原来有机物中化学固定的能量约有90%变成甲烷,5—10%的能量用于新微生物的形成,还有3%作为热量消耗掉。这与好氧的降解过程形成了鲜明的对照,在好氧分解过程中,可用能量的60%左右用于新细胞的生长,40%左右以热能散失。

最普遍的厌气反应器或消化器是以连续或半连续方式运转的CSTR(图12d)。用这一系统将浓缩后的废水(如城市污水处理产生的污泥)在30℃左右的温度下与厌氧微生物混合,并选择持水时间(水在反应器内停留的平均时间),便可有效地使废水稳定化并获得甲烷高产。对于来自食品与发酵工业的中等浓度的废水,采用的技术是使微生物生物量在连续运转系统中保留较长时间。这样,固体停留时间与液体停留时间被分开,并且在消化器中可以获得高浓度的微生物,从而得到高的降解速度。很稀的废水(如城市污水)需要有很长的固体停留时间并且只能用流化床过程来获

得（见第四章）。

甲烷发酵的典型例子是中国的沼气计划。中国建立了几百万个家用型无氧生物反应器。这种反应器被用来处理家畜（禽）粪便、人类尿和秸秆，产生的沼气用于炊事与照明。这种反应器既是废物处理的卫生设备，又可提供很好的肥料。

如果单位体积负载为每米³反应器每天4公斤干物质，并且平均停留时间只有10天，那么一个满载的甲烷生物反应器可望达到每米³反应器每天正常产气1米³。

活性污泥法被广泛用于废水和其它工业废物的氧化处理。这些方法使用分批或连续搅拌式生物反应器系统来增加空气卷入和加速有机物的氧化分解（图12e）。这些生物反应器很大。为了最有效地发挥功能，大多数城市废水处理厂的生物反应器装有几个或多个搅拌器单元，以利混合和氧气吸收。由于它们是开放系统，偶尔会有气味问题。

工业废水的厌氧生物处理方法越来越被人们所接受，这是因为用这种方法

- (1) 不需要通风因此节约能量；
- (2) 有机物高度转化为沼气，沼气可用作燃料；
- (3) 没有气味问题；
- (4) 很少产生残泥；
- (5) 通过微生物操作，可形成高价值的产品。

3.4 培养基的设计

培养基的设计必须满足产生菌的营养要求、生产目的和生产规模的需要。对于多数大型生物工程过程来说，培养基

组分的成本、可用性和加工处理特性是决定选择的主要因素。

培养微生物的基本营养要求（动植物细胞的营养要求将在后面讨论）包括能源或碳源、有效氮源和无机元素，有的还要求生长因子。对于大多数生物工程过程来说，碳源与氮源更经常地是来自相当复杂的廉价天然产物或副产物的混合物（表14）。而微量金属元素则通常在自来水和主要原料中已经足够了。氮、磷、硫、钙等元素常用盐作补充来源。生长因子在必要时可以用纯的形式提供，但出于经济方面的考虑，生长因子一般用动植物提取液的形式加入。所需生长因子的主要种类包括B族维生素或有关化合物、某些氨基酸和一些脂肪酸。如果不利用pH控制，则碳源和氮源的适当平衡对于生产过程的pH模式是重要的。在大多数生产过程中，养分必须溶解于水。在分批培养中，养分通常都存在于起始的体积中。通过按一定速率供给其中的一些养分可以对分批系统的发酵反应作进一步调节与控制（喂料分批培养）。这样，诱导物的基本浓度可以保持不变。养分的可用性对于发酵反应与产品形成发挥着强有力的生理控制作用。

培养基的配方首先要从经济上考虑，因为在发酵生产的可变成本中原料成本可占60~80%。由于日用品市场价格随季节和其它因素的变化而波动，所以发酵原料的选用主要决定于当时的材料价格。此外，材料的选择还必须考虑处理费用与贮存费用、配方与灭菌的难度以及健康与安全问题。

培养基配方和发酵期间特定养分可用性对产品优化影响很大。因此，如果发酵的目标是生物量或与生长有关的产物，则培养基应自始至终能使生长潜力得到最大发挥。如果产物是不受生长限制的化合物（如有机酸、抗生素等），在起

表14 工业培养基的碳水化合物和氮素来源

碳水化合物来源	氮素来源(氮素重量%)
葡萄糖——纯葡萄糖单水合物、 水解淀粉	大麦(1.5—2.0) 甜菜糖蜜(1.5—2.0) 玉米浸提液(4.5)
乳糖 ——纯乳糖、乳清粉	花生粉(8.0) 燕麦粉(1.5—2.0)
淀粉 ——大麦粉、花生粉、 燕麦粉、黑麦粉、大豆 粉	药物中间体(8.0) 黑麦粉(1.5—2.0) 大豆粉(8.0) 乳清粉(4.5)
蔗糖 ——甜菜糖蜜、甘蔗糖 蜜、红糖、纯白糖	

始生长期后，可改变培养基使它缺少某种或几种养分。根据被研究的生长过程的具体性质，尤其是是否需要某种次级代谢产物，利用限量的磷、氮、碳水化合物和某些痕量元素、现已获得成功。有的发酵过程要求培养基中有诱导物存在，有的过程可能会受到培养基中某种成分抑制。降解产物的抑制问题尤为常见，在含有葡萄糖的培养基中经常出现这种情况。这种过程被抑制的问题，可以通过使用可缓慢发酵的碳水化合物或部分水解的淀粉代替葡萄糖来加以避免。对于某些特定的发酵过程还可以使用递增流加或连续流加某种浓缩组分的方法。

工业培养基的配制不仅要考虑生产过程中发酵阶段的需要，还要考虑随后的纯化过程的需要。培养基的配方还应该力争使最后的发酵液粘滞度低、细胞物质易分离和可能影响终产品特性的残余化合物的含量低。

培养基的灭菌方法必须最大程度杀死污染菌，并且保证温度对培养基成分影响最小和无机盐沉淀最少。培养基灭菌

时，细菌芽孢是一个严重问题，因为只有当温度超过 100°C 时才能杀死它们。但在这样的高温下，培养基的许多成分容易发生变化甚至被破坏。这时，必须采用其它灭菌方法，如过滤法或辐射法等。大多数培养基在反应器中进行分批灭菌仍然是可供选择的方法，不过连续法正在被人们更广泛地接受。连续灭菌过程在 120°C 以上的温度下保持较短时间可以有效地杀死孢子而对培养基的养分没有严重的不利影响。实际作法是将培养基通过一个热交换器，并使热交换器在较短时间内将温度升到所需高度从而达到连续灭菌的目的。培养基经过热交换器后被输入一个维持管中，在这个温度下维持一定时间。最后，将培养基在热交换器中逆着输入的冷培养基，然后逆着冷水进行反向循环从而达到迅速冷却的目的。高温短时间灭菌方法有利于生长因子的保存并且很少出现颜色。同时，余热还可以回收利用。除此以外，快速灭菌还可以采用蒸气直接喷射法 ($<140^{\circ}\text{C}$)。

3.5 生物反应器的仪表与过程控制

所有的生物都承受着细胞内外的一系列环境因子（如温度，pH和 O_2 ）的作用。传统的生理生化研究揭示了这些因子，并研究了它们各自的作用规律。在所有的生物工程过程中，优化生产率是必不可少的，而生产率的优化只有通过已知可调节生物活动的多种因子的识别与控制来实现。影响生物活动的有关环境因子有物理、化学和生物化学等诸种，对它们的监测并不总是容易的事（见表12）。

生物反应器的仪表对于度量和计录有关参数，并将所获信息用于改善和优化生产过程（表15）的重要性日趋增加。

实际上,生产过程的控制可通过传感器获得度量数据,然后与一定值(Set Point)比较,两值之差作为改变可操纵生产过程的活化器位置的标准,从而保证度量值与定值较接近。控制器是一种可将度量值与定值比较的物理装置。传感器、控制器和活化器组成一个控制环共同调节特定的因子。

表15 目前与生物反应器联用的仪器

被测参数	使用的仪器
压力	气动或应变仪传感器
发酵罐内含物量	
体积	顶部和底部的差压传感器
重量	将发酵罐架在负载传感器上
pH值	玻璃电极与参比电极
搅拌速度	转速计
气流	可变范围式流速计、孔板流量计
CO ₂ 产生量	红外线分析仪
O ₂ 消耗量	氧化锆分析仪
溶解氧	溶解氧极谱电极
温度	热电偶、电阻温度计、热敏电阻、毛细管

检测生物反应器的控制参数可用两种方式进行:在线检测和离线检测。在线检测是将传感器直接放入加工液流中,离线检测是通过无菌操作从加工液流中取出样品进行分析。理想的传感器必须能够经受蒸气消毒、能产生连续的可靠信息、能进行在线操作、容易校准、结实耐用和对生产过程无不良影响。在线传感器不能对生物反应器过程进行有效检测和控制,是发酵工程发展中的主要障碍。较普遍的在线传感器有温度、pH、压力、气液体流速以及CO₂和O₂的传感

器。目前还很缺乏可用于在线检测 DNA、RNA、酶和生物量等重要参数的可靠装置，这使得整个生物反应器过程受到严格限制。对于这些化合物的检测仍然需要离线进行。由于离线分析在取样后一般需要几个小时才能获得结果所以不能直接用于控制操作。

下面简单介绍几种被确认的在线系统和一些即将付诸应用的在线检测技术。

3.6 检测技术

3.6.1 温度 温度通过影响反应速度、酶催化活性或酶稳定性的动力学效应影响着生物学过程。用来监测生物反应器温度的传感器很多，其中包括热电偶，阻抗温度计、热敏电阻和毛细管等。它们都能产生可被控制环利用的输出信号。大容量反应器需要多个温度传感器才能保证整个发酵体积内温度有合理的分布。

3.6.2 pH 大多数生物的生长对pH的变化都很敏感，各类生物都有它们特定的最适pH值范围。产品形成的最佳pH值通常不同于生物生长的最佳pH值。据信，pH值主要影响细胞壁的透性和细胞外壁酶催化的反应速度。pH传感器或离子选择性电极已在生物反应器中被广泛应用。现代的pH探针可经受蒸气消毒和相当程度的处理。

3.6.3 溶解氧 生物反应器中使用的大多数生物需要恒定供给氧气。加工液中溶氧量可用溶解氧探针来检测。生物活性与溶解氧的关系常成为大多数生物工程操作最终取得成功的重要决定因素。溶解氧探针有两种类型：电动式和极谱式。它们在设计上没有明显差异。都是在一个玻璃的或不

锈钢的外壳中装有两个电极。溶解氧探针的主要问题是灵敏度低，在溶解氧浓度低的情况下使用不十分可靠。它们还可能随时间发生大的偏差并且不耐重复消毒。

反应器内氧的摄取速度可通过顺磁氧气分析仪或质谱仪（该仪器速度较快但成本高得多）测量入口或出口气流中的氧气浓度而获得。

3.6.4 溶解的二氧化碳 测定发酵液中 CO_2 的溶解水平可以提供大量有关生产情况的信息。现在，可用覆膜电极测定 CO_2 的溶解量，但它们成本高，可靠性差。在线测定气态 CO_2 可用光谱、气相色谱或质谱法进行。

3.6.5 固定化酶探针 这种新一代的探针是使固定化酶靠近电化学传感器（通常为溶解氧或pH探针）表面而制成的。这种固定化酶可与特定分子发生反应而产生一种可用电化学传感器检测的信号。许多化合物（如葡萄糖、蔗糖、脲、丙酮酸、青霉素、乙醇、乳酸盐、甲烷、胆固醇和几种氨基酸）的酶电极原型已见诸报道。这些电极专一性很强，不受其它化合物影响，容易校准并且灵敏度高。但是，它们反应时间长，不能经受蒸气消毒，至少难以在在线的控制环上使用。然而，酶探针应用的特异性与广泛性无疑会使它们成为将来发酵工程发展中的一个激动人心的领域。

3.6.6 生物量 目前还不能用现实的代价对生物量进行在线的自动分析，但根据气态 O_2 和 CO_2 的物质平衡关系已经考虑了间接的方法。实际上，包括蛋白质、DNA和RNA在内的生物量的测定仍然是离线进行的，这种测定很费时间。

3.6.7 数据处理 以前曾使用记录本或记录纸贮存各种在线和离线的测量数据，这些数据现在更多地采用计算机

的存储器或磁带、磁盘进行贮存。在计算机中，特定生物工程过程的数据以档案的形式贮存起来，这些数据涉及培养基配方、发酵过程和错综复杂的出料加工过程。历史数据的贮存与组织是现在大多数工业发酵过程的一项重要工作。计算机对于了解和控制发酵过程确已成为有价值 and 不可缺少的手段。因此，目前一个功能单位有可能具备过程监测、程序控制、连续控制、计算、数据贮存、数据供给与报告等功能。计算机在生物工程中的进一步应用还包括核酸和蛋白质序列分析、限制性内切酶图谱制作、分子过程模拟，以及设计和调试试验等方面。

3.7 质量与能量的传递

生物体在生物反应器中生长和代谢要求不断提供和摄取必需的养分，同时排出有毒的代谢废物。生物体表面与外界环境进行的物质交换过程叫质量传递。只有向（或从）整个生物反应器系统提供（或排除）某些形式的能量，才能实现质量传递过程，进而保证正常的生物生长与生物学活动。例如，灭菌、控制生产温度需要热能，生物反应器内含物的搅拌与混合需要机械能；生物学活动产生代谢能等等。

质量与能量传递过程是所有发酵过程中的一个重要组成部分。深入理解这些过程对于优化生物工程过程十分重要。控制质量与能量传递的原理来自化学工程的实践。

3.7.1 质量传递 一切生物反应器过程的中心是需要提供适量养分以满足生物体或代谢活动的需要使生物生长与产物形成达到最佳状态。

营养成份从供应相（如氧气喷头、进料口）到达生物体

相需要克服几种阻力。这些物相有连续的也有分散的。连续相通常是液体（水或其它），有时也有气体。分散相有气体（空气、 CO_2 、甲烷等）。液体（烃）和固体（微生物团、絮状物、固定化细胞或固体基质）。质量传递阻力的定位如图15所示。

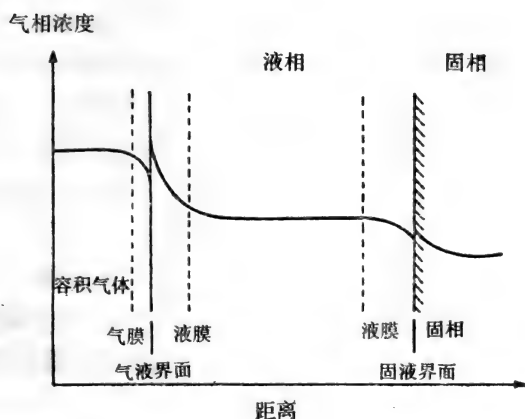


图15 具有气相、液相和固相的系统中质量转移的阻抗

生物工程使用的生物多数是好气性的。因此，在设计生物反应器时氧气的质量传递往往是需要考虑的重要方面。气相与液相之间质量转移的速度受气体组分在液体中溶解度的影响很大。然而，氧气只是微溶于水，因此要提高反应器内生物对氧气的有效利用必须发展氧气扩散技术。目前，监测液相和气相中溶解氧的方法已得到令人满意地发展。这些方

法将另行讨论。 k_La 或溶解氧浓度的测定对于了解生物工艺过程中生物对氧气的可用性很重要。

空气或氧气通过气孔输入反应器系统后产生气泡，气泡的大小以及在发酵液中上升的速度决定着氧气的传递速率。在非机械搅拌系统中（如塔式反应器中），气泡直径的大小决定着两相界面的表面积和气泡上升的速度。相反，在机械搅拌式反应器中（CSTR），气泡大小取决于反应器内总体湍流度和液体的物理性质，而不是气孔和喷头的设计。液体粘度太大，对氧气传递会造成非常不利的影响。

发酵系统中固液两相界面上的质量传递受整个系统的流体力学影响不太大。所有传递靠分子扩散进行。养分（包括氧气）向细胞扩散的速率以及细胞代谢物向外扩散的速率限制着生物活动的速率。这时扩散与反应总是相伴发生的，不是扩散分子的消耗就是扩散分子的产生。

好气性发酵可以看作是一种气/液两相质量转移步骤，一种液/固两相质量转移步骤，或者是一种化学或生物化学反应步骤。混合作用对气/液两相质量转移步骤的影响比对液/固两相质量转移步骤的影响更大。

一个反应器内的培养基组分达到完全而均匀的扩散或混合会随着反应器体积的增大而变得更为复杂。在整个反应器容积内，扩散的机制包括液体的总体流动以及由机械搅拌或液体湍流产生的漩涡形成的夹卷混合作用。混合过程对饲料分批培养和连续培养系统中空气和养料的加入特别重要。

理想的混合装置应该使轴向和径向的分散均达到最佳，以保证反应器的各个部分均有完备的发酵组分（培养基和生物体）存在。这一理想状态很少能够达到。在大规模发酵中，要使加入的组分能够迅速和基本均匀地扩散，必须从多

个口入加入反应器。例如，以甲醇为底物的大型ICI普鲁丁反应器就有2 600个独立的进料口。如果发酵液是非牛顿型并且粘度很大，则在反应器的容积内总有某些部分的液体不能流动，也就不能充分参加整个发酵过程。当轴向扩散接近零，径向扩散为无限值时，将出现所谓的活塞流式生物反应器。

发酵液的充分混合有利于提高质量传递的速率和提高生物学生产率。实际上，在大多数工业发酵过程中，高的生产率必须同时保持低的加工成本才能实现最大的经济效益。常规的CSTR设计需要高功率输入。因此，许多新反应器的设计都试图降低比功率输入并且使功率输入与生产率最佳化。这些新型反应器中，有的可以用低功率输入获得大的界面面积（泡柱式反应器等），而且可以通过一个嵌入的通风管对与气体滞留无关的流型进行强有力的控制（循环式反应器）。

3.7.2 能量传递 在生物反应器操作过程中，系统内产生的能量主要有四个来源。

(1) 机械搅拌能：输入的电能或搅拌机械做的功被转化为液体运动的动能，动能以各种形式散发，最后产生热。

(2) 通气放气能：部分能量会在喷气口处消耗掉并产生旋涡状湍流，这种能量尽管大部分将代表着气体穿过液体静压头时膨胀所做的功。

(3) 代谢能：反应器内的生物体使有机分子氧化，部分能量以热的形式散发。

(4) 热焓：如果输入的流体温度比反应器内含物温度高，则反应器内可能产生热。

热量在反应器中积累可能使发酵液温度超过生产的最佳

温度。结果不得不将热从反应器中排出。热量可以通过固体界面排放到周围的空气中或排放到内部蛇管、外部冷水套或外部换热器内的冷却水中。生物反应器冷却系统的实例如图16所示。当反应器需要在温度高于环境温度的条件下运行时,除了上述装置的发热外,可能还需要提供热源才能保持最佳温度。

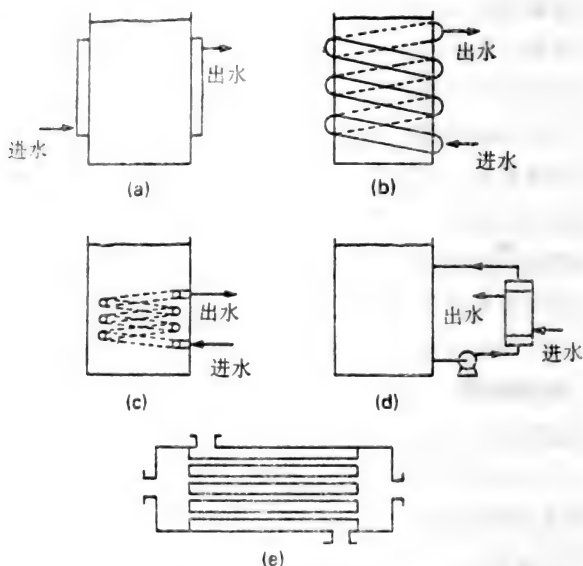


图16 热量排除方法

(a)夹套 (b)外设式半蛇管(尺寸被夸大) (c)内设式蛇管 (d)外设式热交换器 (e)壳管式热交换器(示意图)

3.8 放 大

生物工程的大多数工艺过程是在实验室规模上发展起来

的，这些工艺过程能否在商业上获得成功主要取决于工艺的放大能力，其中包括首先放大到小规模的中试验水平，而后放大到工业化生产规模。工艺的成功放大必须克服物理上和经济上的种种障碍。迄今，工艺放大还无法建立一种统一的设计程序或简单的方法。对于大多数具有商品意义的产品来说，生产用的生物体（包括微生物，动物细胞等）需在营养和各种不利环境条件的限制下进行最优化生产。微生物培养系统通常是异质性的，工艺过程中的问题主要来自养份的传递，其次来自产物的转移（图17；Brown1982）。

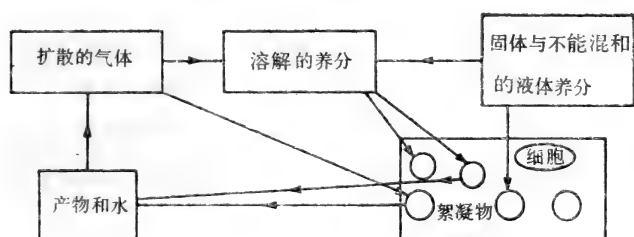


图17 微生物培养系统的异质性

通常可以用实验室规模的生物反应器（5—10升）鉴别一些控制因子，但有的因子则需要用中间试验规模的反应器来鉴别。由一种操作规模转向另一种规模时，有的因子将保持恒定（表16），有的会直接由于规模的扩大而改变（表

16)，有的可以由工艺工程师控制。

表16 与放大有关的因素

保持不变的项目	变化的项目	操作者控制的项目
(a)生物反应器的基本设计及管道安排不变	生物反应器体积将增大	可以改变培养基组分的浓度,也可以用较低等级的商品提供这些组分
(b)操作反应器需要的人员数不变	所需材料与设备的量将增加	常使反应器上的总压力增加到大气压以上
(c)微生物种与菌株类型不变	培养过程前后需要处理的材料量将增加	尽可能减少单位质量的能量输入
(d)培养基组分不变,特有的养分限制作用不变	加工一定数量的材料所需容器的数量将减少	降低叶轮速度,增加液体流量与速度,但可能使涡流减少
(e)灭菌与操作的温度不变	工艺操作过程中由于污染和其它过失造成的损失将增大	调节循环时间与混合时间,使加入的物料与培养物保持适当混合
(f)培养物的流变学特性不变	由于增加了加热与冷却时间总的灭菌周期将发生改变	
(g)气泡大小不变,直径范围仍为0.005—0.2mm	面积与体积比将缩小,器壁的影响实际上将消失	
(h)	表面通气将大大减少	

中间试验工厂实际上是一个大型的实验室,其目的在于考察设备条件的可行性(包括生物反应器、泵、热交换器、贮藏设备、电力与管道设施等)和工艺操作的适应性。工程设

计的标准应该体现操作简便和经济实用，并能够控制废水废气。每个中间试验都将有自己的特点和设计要求。

中间试验工厂的生物反应器总容量范围为100—10 000升。较大的中间试验工厂有时可以作为生产单位使用。用于生产的工业生物反应器容积范围为40 000—400 000升。

由实验室转向工业规模将主要遇到以下问题：热量的排除，氧气传递与可用性，培养基组分（如养份、有毒代谢物、酸和碱等）的不充分扩散。处理这些问题需要在混合通气、监控设施和严格保持无菌操作方面给予高额投资。

3.9 动物细胞的培养

本世纪初以来，哺乳动物细胞、冷血动物细胞和昆虫细胞的培养技术已经成为一种越来越有用的实验室工具，其影响已波及从胚胎学到微生物学的广泛领域。早期的研究由于难以获得适当的细胞数量而普遍受到限制，而现在已经能够对细胞进行大量的悬浮培养或用新颖的微载体系统对细胞进行大量培养。工业上正在越来越多地利用动物细胞培养技术生产高价值的产品，特别是生产疫苗（包括小儿麻痹，流行性腮腺炎、麻疹、风疹、狂犬病等的疫苗）、干扰素、激素、免疫试剂（包括胰岛素，由杂交瘤细胞获得的特异性单抗分子以及胞浆素原和胞浆素原活化剂等凝固因子）。虽然不久，许多这样的蛋白质类物质可以通过将所需基因克隆到简单的微生物细胞，如大肠杆菌细胞中而获得，但仍有很多蛋白质类物质由于非常复杂而难以利用这一途径。因此，对于

这类蛋白质类物质将继续采用在许多方面类似于前面讲到的传统发酵过程的细胞大量培养技术来提供。动物细胞大量培养遇到的主要问题，包括细胞对水源不纯非常敏感，培养成本与质量难以控制和需要防止生长较快的微生物所造成的污染等。由于细胞融合（形成杂交瘤）、染色体转移和工程质粒感染（第二章）等技术的应用，动物细胞培养技术获得了较大的进步和改观。

3.9.1 细胞系 由动物提供并在人工培养基上诱导增殖的细胞叫离体培养物。离体培养物有初级培养物、次级培养物或细胞系。初级细胞培养物是直接从原来那个生物的某种器官或组织取得或由血液提供的细胞，它不论在形态和功能上都属于非同一型的细胞群体。通过用胰蛋白酶反复处理组织碎片可获得游离的细胞悬液，这些细胞也可附着在玻璃、骨胶原和金属等的表面成为单层培养物。初级细胞经过离体处理后成为次级细胞。次级细胞的生长一般是有限的，最终将停止生长。但有的细胞将继续生长并成为传代细胞系，这种细胞系具有在离体条件下无限繁衍的能力。细胞系必须表明在初始分离后能够繁殖70次以上方可称为传代的。细胞系有的来自癌细胞，有的则来自正常细胞。现在，已经在世界范围内建立起广泛的培养细胞系，值得一提的是美国类型培养物收藏中心（American Type Culture Collection）搜集了500多种细胞株。

3.9.2 培养基 培养基的选择取决于所用细胞系的特性。培养基应包括四种基本组份：基本培养基、血清、添加剂和缓冲系统。每种组份在最后的配方中均有特定的功用。各组份的相对用量必须根据前人的研究和本试验的特殊要求确定。培养基可以在实验室自行配制，也可以在市场购买其液

体，10倍浓缩的液体、粉末或可高压灭菌的粉末。所有细胞培养的一个重要特点是水源的纯度问题。用来配制培养基的水中常能见到细胞生长的抑制因子。一般来说，经过反渗透纯化的水是制备培养基的最合适水源。重建培养基的灭菌最好采用膜滤法。血清早已成为培养基设计中的基本组份。但是，由于每批血清维持细胞生长的能力不尽相同，因此最常用的办法是将几批血清混合起来，重新分装和贮存。血清还可能供应不足。血清在细胞完全培养基中的确切作用还不十分清楚，但一般认为起码有四个作用。这些作用是（a）为低分子量的养份提供载体；（b）为培养的细胞提供必需的激素（胰岛素）；（c）防止搅动时造成的机械损伤；（d）促进锚地依赖性细胞与表面粘结。血清因动物而异，不同年龄、性别和不同营养状况的动物提供的血清也不相同。

由于存在以上问题，现已研制出无血清培养基和使用价格较低并且较容易获得的血清类型配制的培养基。现在有一些化学性能上较清楚的培养基可产生较好的生长繁殖效果，但大多数培养基仍需要加入昂贵的生长因子或激素。其它添加物（包括抗生素）全部都要采用无菌操作技术加入。缓冲系统通常是由维持培养基pH值和渗透压的无机盐人工混合而成。动物细胞在组织培养的全营养培养基上生长时通常以7.2—7.7的pH缓冲值范围最适宜。

各级培养的微生物污染问题是动物细胞培养的常存公害。动物细胞培养使用的丰富培养基对大多数常见的污染微生物都非常适合。空气幕无菌操作室为多方面的培养物处理提供了特殊的防护。较大规模的培养工作必须严格遵守无菌操作规程。

3.9.3 细胞培养系统 虽然动物细胞的大量培养比微生物

细胞的大量培养更复杂，要求更高，但各个工序的技术正在迅速接近大多数微生物系统中所达到的水平。动物细胞大量培养中使用的培养系统主要有两种类型——单层培养和悬浮培养（图18）。单层培养系统要求有可供细胞生长的固体承载物，这是使单层培养难于放大的因素之一。相反，悬浮培养系统是在整个培养物混合体系中自由生长，其方式与大多数微生物系统相似。悬浮培养系统的放大不大成问题，因此，更有利于大规模商业化生产的利用。

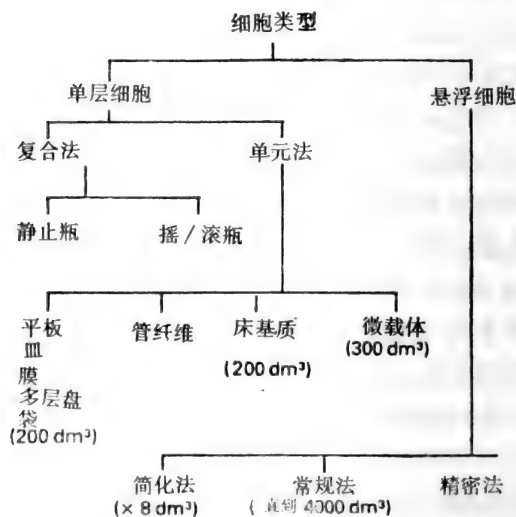


图18 用于动物细胞大规模生产的设备

历史上，病毒疫苗的开发与利用导致了医学和生物工程

的巨大成就。最老的疫苗，如天花、黄热病和狂犬病的疫苗曾在动物上繁殖，后来发现受精的鸡蛋可作为几种病毒的优良基质。随着动物和人类细胞单层组织培养技术的发展，疫苗的生产发生了戏剧性的变化。许多不同的病毒可以用这种方法在严格控制的条件下生产疫苗，如脊髓灰质炎疫苗。近年来，重组DNA技术已经能够使特定的病毒结构组份在细菌中进行合成，而单克隆抗体技术现已能够将抗原的决定簇限制在病毒粒子的表面，这些粒子主要负责诱导对疾病的免疫性。

3.9.4 单层培养或锚地依赖性培养 大多数动物和人类细胞的培养要求有能供细胞固定的表面存在。这种锚地依赖性细胞的连续生长取决于可用的表面。当这一表面被单层细胞覆盖或挤满后，细胞将停止生长。这种现象叫接触抑制或密度抑制，它是这类细胞大规模操作时的最严重障碍。大多数具有生物工程潜力的细胞类型，即适于生产疫苗、干扰素和激素的那些细胞类型都表现有这种形式的生长。

已经有人提到过很多适合锚地依赖性细胞培养的方法，其中包括各种类型的旋转瓶系统、板式和填充床式反应器和几种空心纤维表面类型（图19）。这些技术大多数需要定期给细胞补充新鲜培养基，并且要力争保证pH和CO₂等参数的一致性。细胞生长与产品产量比理论预期值少，并且整个系统由于表面与容积比值的要求而难于放大。

现在，以上缺点大多数可以通过将锚地依赖性细胞培养在可通过缓和搅拌而悬浮的各类小颗粒（微载体系统）上的方法来克服。这种方法可以使细胞在更均质的培养系统内生长，并且具有较大的控制和放大潜力。每立方厘米体积内微载体的数目可为5000—25000，从而为细胞繁殖提供了巨大的



图19 用于培养锚地依赖型细胞的各种方法的面积与体积比 (cm^{-1})

(a) 壳套 (b) 外设式半蛇管 (尺寸被夸大) (c) 内设式蛇管 (d) 外设式热交换器 (e) 壳管式热交换器 (示意图)

表面积，并且颗粒大小易保持悬浮。早期是用火棉胶覆盖的 DEAE-Sephader A50 (Pharmacia) 颗粒作微载体，但现在用血清覆盖的颗粒和经过热处理的胎牛血清覆盖的颗粒

作微载体，其它载体还有经过处理的聚苯乙烯和聚丙烯或二乙氨基乙基被取代的纤维素纤维。用这些微载体系统可获得很高的表面积和体积比值。例如，1毫克Cytodex微载体颗粒在每 cm^3 的培养液中可产生 $5\text{cm}^2/\text{cm}^3$ 的表面积，这样大的面积反过来可以支持 $750-10\,000 \times 10^3$ 个细胞/ cm^3 的生长。颗粒浓度可增加到 $5-7\text{mg}/\text{cm}^3$ 而不出现毒性效应。

一般的生物反应器方法可用于微载体培养，但最好使用低速搅拌以避免剪切效应和使细胞脱落，但对圆底反应器来说最好要避免载体的沉积。这些培养系统有利于更换培养基和清洗细胞培养物。使用特殊的可将载体保留在液体中并且允许培养基作连续改变的附加过滤器装置可以使连续操作成为可能。pH值可以通过增加混合气体中 CO_2 的浓度或加入 NaHCO_3 和 NaOH 的方式加以控制。使 O_2 进入生物反应器是困难的，并且很少采用液内喷气，因为这样易产生泡沫问题。因此，采用了使 O_2 或空气吹过培养物表面的方法来获得缓慢的氧气交换。细胞可用胰蛋白酶处理或用物理操作方法从微载体上取下来。

3.9.5 细胞悬浮培养 悬浮培养方法已经在几种类型的细胞（包括人细胞）中得到应用。这一方法的明显优点是培养体积大和成本低。由于细胞处于较均匀一致的培养基中，因此可获得稳定状态，并且放大要容易得多。

人类转化细胞有很多特性与癌细胞相似，它可以在悬浮培养基上较好地生长。由于一些可转移的有害因子可能被转移到产品中，人们对利用转化细胞生产药物产品表示担心。要排除这种可能，必须使产品的纯化过程严守高标准。转化细胞（如类淋巴母细胞）正在被用于大量生产人类干扰素。

悬浮培养的基本发酵技术与前面讲过的微生物培养技术

原理上基本相同。干扰素生产利用磁力搅拌的不锈钢罐进行，罐的容量达4000升。

大型悬浮培养的通气问题可能成为细胞生长良好的一个障碍。为了使气泡最大程度地分散而进行高强度发泡，可能引起细胞的物理损伤。对于特别脆弱的细胞系统目前采用了纯氧扩散技术。

细胞大量培养技术正在迅速发展，但在它能够与得到充分发展的微生物培养技术相媲美之前，仍有许多问题有待解决。

3.10 植物细胞的培养

园艺学上早已利用植物器官（如枝条、叶片等）的无性繁殖对多种植物进行选择 and 快速繁殖。后来发现，植物根尖、形成层和植物瘤组织较容易在人工培养基上进行无菌生长。通过精心选择培养基和其它环境因子，可使许多种植物分化和产生完整的植株。整个周期分四步进行：（1）定植培养；（2）器官发生；（3）幼苗长大；（4）土壤培植。这种类型的组织培养在商业上主要用于快速繁殖用作种苗或销售的植物。

园艺学家可在较短时期内用单个亲本通过无性繁殖产生大量相同的植株，这体现了许多植物组织的再生能力。由于这种方法在生产上有很多优点而被广泛采用，如利用植物组织的无性繁殖方式可以终年连续生产，可快速繁殖常规育种方法培育的新品种，可通过茎尖培养生产无病毒种苗并可利用单倍体植株进行遗传改良。此外，这项技术对于大量生产通过原生质体融合和重组DNA技术获得的经过遗传修饰的

细胞也很有价值。组织培养还可用于特定种质的长期保存、提供稳定的遗传材料和减少贮存空间及费用。

植物细胞还可以通过不同方式培养，产生各种有价值的药品、染料和香料(这些物质通常只能由完整的植株产生)。大约25%的临床药物和许多有用的上等化学品仍然是由植物产生的。植物细胞的培养可采用与传统的微生物发酵方法相类似的方法进行，因此为生产那些低容量高价值的产品提供了合适的手段。目前利用植物组织培养生产的产品有类固醇、强心甘、抗癌生物碱、可待因和3, 4-二羟基苯丙氨酸等。此外，这类生物工程方法作为将来抗生素、杀虫剂、食物香料和着色剂的主要来源是非常有希望的。但是，用这种方法生产某种化学品必须首先考虑两个问题：(1)是否有利可图；(2)能否克服传统生产中存在的问题。

植物细胞培养在生物工程中的应用将需要建立细胞的大量培养技术。许多植物现已能够常规地产生愈伤组织和在适当的培养基上保存(细胞在培养基上以无组织的细胞团状态生长，并且这种细胞团主要由未分化的细胞组成)。进行液体悬浮培养的植物细胞以单细胞和细胞团相混合的形式生长。培养物的均匀一致性是在植物细胞培养中人们孜孜以求的目标。用机械、化学或酶的方法可以破坏细胞团获得分散良好的培养物。植物细胞不是锚地依赖性细胞。

早期的植物细胞研究必须在用椰子乳和其它不确定的生长调节剂配制的复合培养基上进行，而现在限定培养基已被广泛使用。限定培养基一般含有无机盐、碳源或能源(一般为葡萄糖或蔗糖)以及特定维生素和生长调节剂(如吲哚乙酸、2, 4-D或细胞分裂素)。培养基的具体配制与培养的细胞类型和生产的产品类型有关。与培养哺乳动物细胞的培

培养基相比，培养植物细胞的培养基相对简单和便宜些。

用液体深层培养法大量培养植物细胞主要借鉴于微生物中使用的方法。与微生物相比，植物细胞的培养更复杂（因为植物细胞生长较慢，且有发展成小的组织团块的趋势），但在培养的主要特点上（如异养性质、质量传递、剪切力以及发酵过程控制等）与本章前部分讨论过的微生物过程十分相似。

在大多数细胞培养过程中，细胞加倍时间一般为20~40小时（而细菌加倍时间为30分钟左右）。加倍时间的长短与植物细胞的大小有关。培养的一般植物细胞的大小可达细菌细胞的200 000倍，植物细胞培养的生长周期可包括延缓期和随后出现的相当于指数生长的周期，最后是稳定期。植物细胞体积大并且很脆弱，因此给混合、通气与质量传递带来了很大的困难。植物细胞培养时考虑过采用各种混合系统，如扁平浆片的涡轮机、螺旋桨和起泡柱。由于植物细胞有较强的抗张强度和较低的耐剪切能力，气升式反应器比涡轮机搅拌器更为适用。气升式反应器还具有成本较低，构造简单和容易消毒的优点。

商业上利用植物细胞大量培养的主要领域是生产特定的植物产品。这些产品通常由植物产生、有复杂的结构和立体化学、存在的量很有限，并且合成这类化合物的基因至今仍无法用微生物进行克隆（因为大多数植物的次级产物是由多基因控制的）。据发现，在许多情况下，悬浮培养可得到与亲本植株相似甚至更高的产物产量（如尼古丁、生物碱和人参甙的生产）。有利可图的发酵生产只能寄希望于高价产品（表17）。在商业上，用植物细胞培养方法生产化学品，在多数情况下至少需要20~30年时间才可能具有吸引力。然

而，用植物组织培养方法生产的首批商品化合物——紫草宁（一种染料兼药品）——现已开始在日本以\$4000/kg左右的价格应市。

表17 一些植物次级代谢产物的市场价格

化合物	用途	批发价	估计零售市场 (百万美元)
长春花碱/ 长春新碱	白血病	5000美元/g	18—20(美国)
阿吗碱	血液循环 问题	1500美元/kg	5.25(世界)
毛地黄	心脏病	3000美元/kg	20—55(美国)
奎宁	疟疾、调味剂	100美元/kg	5—10(美国)
可待因	镇静剂	650美元/kg	50(美国)
茉莉油	芳香剂	300美元/kg	0.5(美国)
除虫菊酯	杀虫剂	300美元/kg	20(美国)
薄荷油	调味剂、 芳香剂	30美元/kg	85—90(世界)

3.11 固相底物发酵

固体底物发酵是指微生物在无游离水或几乎无游离水的固体物质上生长的过程（表18）。固体底物发酵的上限（即游离水开始出现以前）是吸水率的函数，因此也是含水量的函数。反过来含水量又取决于底物的类型。底物含水量为12%左右时，生物学活动停止，随着含水量接近这个数值，微生物活动也随之变得缓慢起来。固体底物发酵与泥浆发酵（即带有高浓度不溶解固体的液体）和液体培养基中进行的

表18 固体基质发酵的一些例子

实 例	基 质	有关微生物
蘑菇生产(欧洲与东方)	草秆、粪肥	二孢蘑菇 (<i>Agaricus bisporus</i>) 香菇 (<i>Lentinus edodes</i>) 草菇 (<i>Volvariella volvaceae</i>)
东方发酵品	小麦和大豆	米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
酱油	大豆	根霉(<i>Rhizopus sp.</i>)
印尼香蕉豆花生饼素	花生压缩饼	好食链孢霉 (<i>Neurospora sitophila</i>)
乳酪	凝乳	娄地干酪青霉 (<i>Penicillium roquefortii</i>)
金属浸沥	低级矿	硫杆菌(<i>Thiobacillus sp.</i>)
有机酸 酶 堆肥	甘蔗、糖蜜 麦麸等 混合有机物	黑曲霉(<i>A. niger</i>) 黑曲霉(<i>A. niger</i>) 真菌、细菌、放线菌
污水处理	污水组分	细菌、真菌、原生动物

固体底物发酵都不同。固体底物发酵中使用得最多的底物是谷粒、豆粒、麦麸、木质纤维材料（如木头、稻草和其它许多动、植物物质）。用于固体底物发酵过程的化合物无一不是多聚体分子，它们不溶解于水或很少溶解于水，但便宜、容易获得，而且可作为浓缩的养料来源。

固体底物发酵过程有着悠久的历史。几百年前，东方就已经开始了固体底物发酵的实践。很多东方食品（如酱油、日本豆酱、印尼香蕉豆）的发酵过程都要经过一个必不可少的固体发酵期。固体底物发酵还被用于生产酶和其它化学物（如柠檬酸）。在西半球，固体底物发酵主要用于动、植物

废料的堆肥、青贮、蘑菇栽培和奶酪制造等方面。将来，木质纤维的固定底物发酵过程很可能成为生物量、乙醇、甲烷和其它许多有商业价值的产品生产的主要工业手段。大多数可以用微生物工程生产的产品都能用固体底物发酵方法产生。这种方法的可行性取决于是否比液体发酵过程有更大经济效益。

在固体底物发酵条件下生长良好的微生物类型主要由水分活性因子 (a_w) 决定。底物的 a_w 值从数量上反映了微生物活动对水的要求。

$$\ln a_w = \frac{-v m \phi}{55.5}$$

上式中， v 等于形成的离子数， m 等于溶质克分子浓度， ϕ 等于克分子渗透系数，55.5 等于纯水的水溶液克分子浓度。

纯水的 $a_w = 1.00$ 。随着溶质的增加， a_w 值相应减小。据发现，细菌主要适应高的 a_w 值，而某些线状真菌和几种酵母菌适应的 a_w 值为 0.6~0.7 之间，固体底物发酵有关的微生物一般适应低的 a_w 值。

3.11.1 微生物类型 根据发酵过程利用的微生物类型（地方种、纯种或混合种）可将固体底物发酵分为很多不同类型。

利用地方种进行的发酵主要有青贮和堆肥。青贮是利用农业植物进行的一种厌氧过程。青贮过程在 25°—30℃ 温度下进行，持续 1—2 个星期。保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 成为优势种，产生乳酸，抑制潜在的腐败细菌。由于没有氧气存在，好氧的霉菌无法生长。为了保证耐渗透压的乳杆菌活动旺盛成为优势种，湿度要求严格控制在 50—65%。相反，堆肥涉及的微生物很广，从嗜温性的细

菌、酵母菌、霉菌到嗜热性的放线菌和真菌都涉入其内。因生物活动而发热是堆肥的一个严重问题。为了避免微生物因发热死亡，堆肥必须进行机械性翻动。用于蘑菇生产的堆肥是创造性地利用木质纤维素材料最有效的方法之一。

用真菌纯种进行的固体底物发酵可用古老的日本酒曲工艺做很好的说明。日本酒曲工艺是用真菌米曲霉(*Aspergillus oryzae*)进行的谷物或大豆的发酵过程。用米曲霉的纯培养物接种到煮过的底物上并使之在盘中或转动的特殊反应器中进行浅层生长。培养物产生淀粉酶可使底物中的多聚物降解。日本酒曲工艺是其它类型发酵过程的基础(包括酶、有机酸和乙醇的商品生产)。日本酒曲工艺还在寻找用淀粉(Raimbault/Alazard过程)和纤维素材料(Waterloo过程)生产生物量的新用途。

某些固体底物发酵过程，特意使用已知的混合培养物接种，以取得最佳的终产物形成效果。例如，用解纤维素毛壳霉(*Chaetomium cellulolyticum*)和解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)的混合物将稻草转化为真菌生物量比只利用其中任何一种真菌时更有效。据认为，这种发酵过程对于木质纤维材料的低技术转化具有很大潜力。

很多固体底物发酵过程要求对作为底物的材料进行预处理以增强养分的可用性或减小颗粒体积以便优化发酵过程的物理参数。多聚体分子可能需要进行部分水解才能供生物生长利用。适当的颗粒体积可通过多种形式的物理加工(如球磨等)获得。预处理的成本必须与产品价值相适应。

此外，固体底物发酵过程的设计要满足建立良好的传质和传热特性的要求。颗粒间传质与颗粒内扩散是限制固体底物发酵过程的两个主要质量传递步骤。

3.11.2 颗粒间质量传递 固体底物发酵时，颗粒大小决定着底物团内部可由空气占据的（空隙空间）的大小。大多数发酵过程与好氧微生物有关，并且向空隙空间转移的氧的多少是有效控制生长与产物形成的重要参数。氧气传入空隙空间与含水量水平关系很大，因为游离水多时空气被挤出，因此空隙空间小。实际上，氧气在颗粒间的有效传递可通过精心混和与通气来实现。氧气水平可以在底物团内部监控，必要时可进行间断性混和与通气。在空隙空间内还必须避免 CO_2 的积累。

3.11.3 颗粒内质量传递 颗粒内质量传递与发酵底物内养分与酶的传递有关。利用线状真菌进行固体底物发酵时，菌丝不但在颗粒表面生长，还穿透到底物团内。好气的菌丝需要氧气的扩散来支持它们的继续生长。氧气在这些复杂固体底物团粒中扩散的动力学问题远未弄清。

颗粒内质量传递还关系到一些酶的作用，它们能将不溶于水的多聚体水解为可溶性底物供正在生长的真菌所利用。因此，这些水解酶在整个降解或底物利用过程中具有重要作用。具有开阔孔面结构的底物比那些孔面较小的底物更容易被降解。利用固体底物发酵方法对纤维素物质的酶解作了广泛的研究。研究表明纤维素物质的酶解依赖于一种酶复合体，纤维素酶的作用。它包括三种类型的酶反应：

（1）使纤维素水解随机产生葡萄糖和纤维二糖终产物，由内- β -1, 4-葡聚糖酶催化。

（2）作用于纤维素多聚体链的非还原性末端产生纤维二糖，由外- β -1, 4-葡聚糖酶催化。

（3）主要作用于纤维二糖产生葡萄糖，由纤维二糖酶或 β -葡萄糖苷酶催化。

3.11.4 热传递 由于单位体积内底物浓度高，微生物在单位体积内产生的热比液体发酵时高得多。此外，这些发酵含水量低、热量传递困难。特别是大规模的操作，热量的排除问题是个重要问题。不能连续通气的系统通过增加通气速率或通气频率可有利于热量的排除。由此推论，当发酵温度太低时，减少通气，一般可使操作温度升高而不需要增加外部热源。实际上，代谢热的产生可用几种方式调节，包括调节空气温度和相对湿度、通气速度和搅拌速度。

3.11.5 生物反应器 固体底物发酵有无搅拌发酵、偶尔搅拌的发酵和连续搅拌发酵等类型。无通气的发酵包括青贮和有限范围的堆肥过程，对此将不作深入讨论。后两种发酵类型可进一步细分为：

- (1) 偶尔搅拌的无强制通气发酵（图20）；
- (2) 连续慢速搅拌的无强制通气发酵（图20）；
- (3) 偶尔搅拌的强制通气发酵（图20）；

上述的第（3）种类型代表了日本生物反应器设计的主要潮流，并且现行系统可以为生物生长与产品形成提供良好的环境。大多数系统被设计为分批式操作但也有几种可适合半连续或连续操作。

液体发酵的过程控制可以使我们更好地操纵反应器内的生物活动，并可通过计算机控制的精密反馈环路的操作对生产过程给予更好地动态控制。相反，固体底物发酵在这方面远远落后于液体发酵。传感器严重缺乏：现有的大多数传感器对固体底物发酵价值很小，因为这些传感器是为检测溶解组份或液体的物理特性而设计的。

固体底物发酵的相对优缺点列于表19。固体底物发酵有待改进的方面将包括底物预处理、过程控制和发酵罐设计。

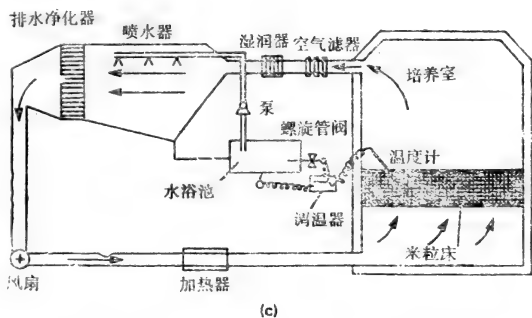
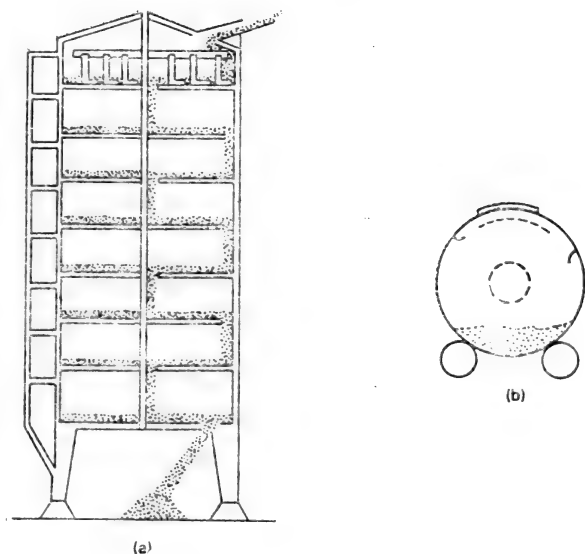


图20 用于固体底物发酵的生物反应器系统

(a)厄普-托马斯塔式反应器 (b)转鼓式生物反应器 (c)日本酒曲生物反应器

表19 固体底物发酵与液体发酵的比较

优 点	缺 点
培养基简单,培养基组分用廉价的天然产物提供,不需要昂贵的人工合成组分	发酵过程主要限于使用耐低含水量的霉菌进行
材料含水量低,因此节省反应器空间,需要处理的废水少,微生物污染少,常常不需要灭菌并且产物加工较容易	在大规模操作中存在着产生代谢热的问题
通过简单的气体扩散或间断性通气就可以满足通气的需要,不必连续通气	过程的监测(如含水量、生物量、 O_2 和 CO_2 水平的监测)难以准确进行
可以获得同样高的产品产量	生物反应器的设计还不够完善
比搅拌罐生物反应器耗能少	产品种类有限
	微生物生长较慢

本章提要

生长是用质量或细胞数量表示的细胞物质的增加。某种生物群体的加倍时间是指生物量增加一倍所需的时间,世代时间指细胞数增加一倍所需的时间。已有一些数学方程可用来描述生物反应器内微生物生长的基本特性。在分批培养中,营养环境不断变化,培养物的生理状态也随之变化。相反,在连续培养中,培养基的加入与取出可以被控制,群体特性可保持稳定状态。

在发酵技术方面,大量细胞被培养在特定的控制条件下进行生物量或产物的合成。一般来说,发酵过程在容器系统即生物反应器中进行,反应器的主要功能是使产品生产或服务的成本最低。生产过程可以认为是成本密集的转换过程或成本密集的回收过程。生物反应器的运行方式有分批、喂料

分批和连续三种。生物催化剂（微生物、动植物、细胞或酶）可以以游离态或固定化形式行使功能。生物反应器过程的优化包括以最少的原材料和能量消耗获得最多的产品。

生物反应器的设计取决于生产过程的性质。连续搅拌罐系统（CSTR）使用最广，它可以用于好气过程的操作，也可用于厌氧过程的操作。CSTR生物反应器的混合过程采用机械操作的带有桨片或叶轮的中心轴进行。相反，塔式反应器不用机械搅拌，内容物的混合通过上升的气泡进行。

培养基应根据生产菌的营养要求、生产目的和操作规模进行设计。培养基的成本是决定发酵过程经济特性的重要因素。大多数工业生产过程以廉价的天然产物的相当复杂的混合物为原材料。动物细胞培养对培养基的要求在成本和营养条件方面都更高。

生物反应器的仪表用于度量和记录特定参数并将所获信息用于改善和优化生产过程。仪表检测可以在线或离线进行。生物反应器的操作还缺乏有效的在线传感器。离线测定速度慢并且不适合计算机系统。利用计算机控制发酵过程在日趋增多。

质量与能量的传递是所有发酵过程的重要组成部分。混合机械旨在创造最好的轴向和径向扩散，保证培养基组分在整个反应器内充分扩散，从而提高质量传递速度和生物学产率。

动物细胞培养正被广泛用于疫苗、干扰素和免疫试剂的商品化生产。大量细胞培养的培养方式主要有单层培养和悬浮培养两种。单层培养需要固体支撑或固定，现已发展了多种方法。这些锚地依赖性细胞现在可以在小的颗粒（即微载体）上很好地生长，因此可以在接近匀质的培养物中生长。

是浮培养在许多方面都类似于通常的微生物培养，但其中的细胞更脆弱，需要采用温和的通气与搅拌系统。

植物细胞培养被园艺上广泛用于多种植物的无性繁殖。植物细胞的生物反应器培养方法现在可考虑用于多种药品和精制化学品的生产。这些方法主要借鉴于微生物方法。

固体底物发酵指在没有游离水或几乎没有游离水的固体材料上的微生物培养。这种发酵过程可利用土生土长的微生物、单一的纯培养物或混合的纯培养物进行。颗粒间质量传递与颗粒内质量扩散是限制固体底物发酵的两个主要因素。

第四章 酶与固定化细胞工程

利用微生物（尤其是酵母菌）生产啤酒、低度酒和其它发酵产品已有数千年的历史。然而，正式将酵母细胞内真正与发酵有关的成份定名为酶还是1878年的事。酶这个词来自希腊文，原意是“在酵母中”的意思。此后的不到廿年内，有人从酵母细胞中提取出酶，并且用它在体外将葡萄糖转化为酒精，从而证实了这些酶的离体催化特性。1926年，有人得到了纯化的脲酶结晶，从而最后证实酶是蛋白质。

以后，随着生物化学这门新学科的发展，科技工作者证实了酶存在于所有生物体内，并能被活的细胞用来催化各种特定的化学反应。接着有人证明，酶的作用有很强的特异性，催化效率高，并可在常温、常压和温和的生理条件下，以及在液体中行使功能。虽然酶的作用位点，一般来说是在活细胞内部。但也有很多酶可以分泌到细胞外的环境中，它们可以分解那些无法进入细胞的有机大分子（蛋白质、脂肪和淀粉），这类酶叫胞外酶，它们是某些微生物正常生长不可缺少的。在商业上首次加以利用的正是这种酶（Priest, 1984）。

4.1 提取酶的商业应用

所有工业发酵品都是生物体内酶活动的最终结果。是否可以用离体酶来代替生物体进行特定的发酵过程呢？这个问

题常常有人提出，但真正获得满意结果的却很少。

可以肯定，采用整个菌体参与发酵有以下不足：

- (a) 机体生长与产品形成的最佳条件可能不同；
- (b) 大量底物可能被转化成生物量；
- (c) 可能有一些不需要的副反应发生；
- (d) 特定产物的转化速度可能较慢；
- (e) 从发酵物中分离所需产物可能比较困难。

因此，利用纯化的离体酶可以减免以上大部分（即使不是全部的话）不足。离体酶的最明显的优点是操作较方便、活性的可预见性较强并且催化作用的特异性较高。然而，对于大多数发酵过程来说，仍将是按传统利用完整菌体来进行。

虽然已经从微生物、植物和动物中分离到2000多种酶，但从使用规模上来看可以被认为对商业产业家或工业用户（或服务业用户）有明显价值的酶还不到20种。目前，商业产业家生产量最大的酶都是些较简单的酶，这些酶主要以粗制酶形式用于食品工业和有关工业以及制造洗涤剂（图21）。这些酶中绝大多数是水解酶，如淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白质酶等。它们主要在面包、牛奶、酿造和果汁工业中用作添加剂或用作加工过程的辅助剂。在大量生产粗制酶的同时，某些高度纯化的酶的市场正在迅速扩大（如葡萄糖异构酶和葡萄糖氧化酶）。这些酶以及许多其它酶正在越来越多地用于医药工业、治疗学以及临床与化学分析。

4.2 酶的来源

商业用酶来自动植物组织和某些微生物。传统上由植物

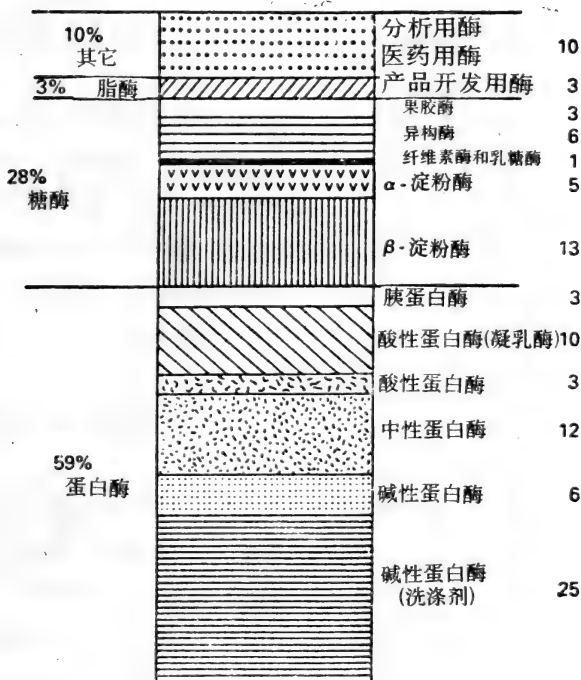


图21 工业酶分布图

提供的酶有蛋白酶（木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶）、淀粉酶、脂氧合酶和其它专化酶。由动物组织提供的酶主要有胰蛋白酶、脂肪酶和用于奶酪制造的凝乳酶。无论是从动物还是植物来源的酶，供应上都可能存在许多问题。就植物酶而言；有季节性变化、浓度低和加工成本高的问

题，而来自肉品工业副产物的酶则存在着来源有限和与其它用户竞争的问题。现在很明显，许多这种传统酶源已经不适应当今世界对酶的要求，为了广辟新老酶源，人们正在越来越多地求助于微生物。

实际上，能够用于酶生产的微生物是很有限的。人们特别喜欢使用长期以来在食品和饮料工业上用作生产菌的微生物。厂家使用未经检验的微生物生产产品，必须获得法律机关的许可，这一过程是特别花钱的，因为获准之前必须进行产品毒性与安全性的估价。由于这个原因，目前的大多数工业微生物酶的生产都局限于使用仅有的11种真菌、8种细菌和4种酵母菌。厂家开发新酶品种实际上也离不开这些微生物(表20)。要利用更多的微生物发展酶的生产必须寻求更加经济可靠的安全试验方法。

酶生产方案的选择非常复杂，特别是所采用的培养方式将决定对菌株的选择。事实表明，有的菌株只能在表面培养时（或在团体培养基上培养时）获得较高的酶效价，而有的菌株则更适合于液体下培养。因此，生产技术的选择必须与最终的商品生产过程相衔接。

4.3 酶 的 生 产

生物体选出后，必须在能使酶产量达到最高的条件下生长。与胞内酶相比，胞外酶有一些特别的优点，因为它们的生产不需要采用昂贵的细胞“破裂”技术；此外，胞外酶以相当纯的形式存在于培养液中，不需要复杂的分离和纯化处理，而胞内酶则相反（见第五章）。目前，工业微生物酶主要是胞外酶，但胞内酶作为诊断酶正在医学和工业上发挥

表20 一些重要商品微生物酶的来源与用途

酶	来源微生物	用途
乙醇脱氢酶	啤酒酵母	乙醇分析
α -淀粉酶	米曲霉 枯草杆菌	广泛用于食品 工业、纺织品脱 浆
淀粉转葡萄糖苷酶	黑曲霉, 米曲霉	用玉米糖浆生 产葡萄糖
天冬酰胺酶	黑曲霉, 凝结芽 孢杆菌, 沙门柏干酪 青霉	治疗急性淋巴 白血病
过氧化氢酶	黑曲霉, 活青酶 溶壁微球菌	在许多过程 中用于脱氢
纤维素酶	绿色木霉	干制蔬菜与污水 清洁剂的制备
葡萄糖苷构酶	凝结芽孢杆菌、暗 色产色链霉菌	用玉米糖浆生 产果糖
葡萄糖氧化酶	黑曲霉、产黄青霉 点青霉	果汁和其它产 品的去氧
转化酶	啤酒酵母, 卡尔斯 伯酵母	制造软心巧 克力
脂肪酶	黑曲霉、白地霉、 阿里根霉	改善冰激淋、 乳酪和巧克力的 风味
果胶酶	黑曲霉、米曲霉	果汁澄清、 咖啡豆发酵
青霉素酰基转移酶	大肠杆菌	生产半合成 青霉素
青霉素酶	枯草杆菌	治疗青霉素过敏
细菌蛋白酶	枯草杆菌	生物学洗涤剂、 肉品嫩化剂
真菌蛋白酶	米曲霉 啤酒酵母	面包的生面软化 产生蛋白质合成 用的ATP
丙酮酸激酶	产气气杆菌	处理麦芽汁
支链淀粉酶、凝乳酶	毛霉	乳酪生产

越来越重要的作用。

被选用于酶生产的微生物应该具有稳定的生产性能和繁殖能力，能够在便宜的底物上生长良好，不产生有毒物质并且无抗生活活动。

目前的工业酶生产主要采用深罐发酵和固体发酵方法。

由于微生物酶通常是低容量产品，在经济上还难以评价如何开发用于深层培养生产的特殊发酵设备。一般说来，生产酶制品的设备与生产抗生素的设备在设计和功能上基本相似。典型的产酶生物反应器由不锈钢制成，带有高功率机械搅拌器和空气喷头，容量为10—50米³。这种反应器具有较大的变通性，通过简单的变换即可生产其它产品。表21列出了工业上用于酶生产的部分工业生物反应器。具体细节可参阅第三章。

胞外酶生产一般采用分批发酵法，整个过程持续30—50小时。当发酵过程进行到产率最高和酶活力最强之间这段时间时终止发酵最合适。终止发酵的最佳时间取决于原材料成本、工厂能力和产品回收的容易程度。

表21 用于酶生产的工业生物反应器的例子

酶	反应器体积(米 ³)	公司名
葡萄糖氧化酶	220	J. & E. Sturge
α -淀粉酶	80	Novo Industri
葡萄糖异构酶	80	Novo Industri
天冬酰胺酶	75	Novo Industri
青霉素酰基转移酶	30	Beecham 医药公司
胆固醇氧化酶	3—5	Genzyme 生物化学公司

虽然连续培养技术可用于实验室规模的酶生产，但还没有迹象表明这种连续培养技术可被任何商业厂家所采用。分批法经常可以扩展，而酶的生产又可通过连续或分批多次加入碳水化合物（或蛋白质）的方法加以改进。

虽然还没有建立酶合成的一般动力学模式，但研究某些酶的调控是可能的。商业上重要的酶中，只有很少几种酶是在生产菌的指数生长期产生的，大多数酶都是在后指数生长期产生。有用酶蛋白的产量一般为培养基起始干重的1—5%，典型酶发酵的细胞产量为培养基起始干重的2—10%。

怎样才能对生物反应器中酶的生产过程进行调节使之符合生产者的要求呢？就特定酶的生产来说，任何已知的限制因子都有一些克服的方法。原则上可从两个方面着手：一是改造菌体的遗传结构，二是改变菌体生长的环境。通常最好的结果要同时从这两个方面着手获得。

微生物的遗传操作方法已经在第二章中进行了讨论，其中的许多（甚至全部）比较成熟的方法已经在酶的调控研究找到了用途。目前，工业上用得最多的方法仍然是突变育种法，但将来重组DNA技术的应用会越来越广，在食品工业以外的其它领域尤其如此。

由于生物体内的代谢调节机制，酶的生产过程中可能出现酶合成的抑制作用。操作人员可以通过选择适当的培养组分或各种培养参数，操纵生产菌的生长环境来避免抑制作用的产生。就诱导酶来说，在培养基中加入诱导物可以非常有效地诱发它们产生。目前使用最广的诱导物是不参与代谢的底物类似物。

降解酶的合成通常受诱导作用和产物阻遏作用控制，而具有合成作用的酶则主要受反馈调节控制。反馈调节包括反

馈(或终产物)抑制和反馈阻遏两种(详见Elander和Demain 1981)。

终产物对酶合成的阻遏可用以下的任何一种或多种方法避免:

- (a) 在培养基中加入抑制剂, 限制终产物的积累;
- (b) 确保提供的培养基中无终产物;
- (c) 选育不受终产物抑制的调控突变型(组成性突变型);

工业上许多重要酶的生产都存在着产物阻遏现象(表22)。产物阻遏在实践中可以通过以下途径避免:

表22 分解代谢产物对酶的阻遏作用

酶	微生物	阻遏性碳源
α -淀粉酶	嗜热脂肪芽孢杆菌	果糖
纤维素酶	里斯木霉	葡萄糖、甘油、 淀粉纤维二糖
蛋白酶	巨大芽孢杆菌	葡萄糖
淀粉转葡萄糖 苷酶	双孢拟内孢霉	淀粉、麦芽糖、 甘油
转化酶	粗糙链孢菌	甘露糖、葡萄糖、 果糖

- (a) 选育抗产物阻遏作用的突变型;
- (b) 避免在培养基中使用有阻遏作用的碳源;
- (c) 通过缓慢加入阻遏性底物等方法, 限制菌体生长或利用可以缓慢代谢的底物类似物(或衍生物)消除酶合成的阻遏作用。

工业上生产的许多重要的次生代谢产物一般只在分化期形成, 即快速生长的起始期(营养期)后形成。这一现象是

在青霉素生产中首先报道的。后来发现许多其它产品的生产过程也是如此。究竟是什么因子导致次生代谢产物开始形成还不清楚，但它与细胞内酶的组成发生显著变化确有关系。酶合成的这种去阻遏作用在表23列出的一些发酵过程中可得到说明。

表23 次级生物合成中生长期结束时去阻遏的酶

酶	次级代谢产物
脘基转移酶	链霉素
酰基转移酶	青霉素
吩噻嗪酮合成酶	放线菌素
合成酶I和II	短杆菌肽 S

固体底物培养法在真菌来源的商品酶生产中具有重要地位，在日本尤其如此。其中，用曲霉生产的淀粉酶，以及用曲霉和毛酶生产的蛋白酶等在商业上的重要性由来已久。用固体基质培养方法生产的其它酶还有果胶酶和纤维素酶。起初，培养物用浅盘培养，采用手工操作。后来，机械系统得到不断完善，清洁、装盘、出盘均可机械操作。转鼓系统（见第三章）的利用越来越广。有人通过与液下培养方法的比较，深入分析了固态系统的优点。用固态培养法生产酶主要有以下好处：

- (a) 单位容量反应器产酶量高；
- (b) 能耗低；
- (c) 控制要求很低；
- (d) 可提取产生高度浓缩的酶溶液；
- (e) 通常设备体积小；

(f) 放大不太难。

培养期间加入底物进行连续培养是可能的。

毫无疑问，目前的商品酶生产主要采用液下培养法，这是因为用这种方法较容易控制加工成本和杂菌污染。酶的生产究竟采用液下发酵还是固体底物发酵，主要看这两种方法哪一种更经济。其实，对很多微生物（特别是真菌）来说，固体底物发酵更接近它们生长的自然环境条件。它完全可以为酶的活力提供较理想的场所。将来固体底物发酵方法能否成功地用于酶生产，主要取决以下几方面研究的结果：颗粒内物质的传递，不溶性底物的降解；生物反应器与过程控制（见第三章）的改进等。

4.4 酶的立法

微生物酶制品必须在毒性和其它安全指标上严格遵守有关规定。对商品酶安全性评价可能涉及到的内容主要有：

(a) 产品中所含的蛋白质（包括酶蛋白和其它外来物质）引起的过敏反应；

(b) 酶的催化活性；

(c) 有毒物质（如毒素）与抗生素的存在。

不同的酶具有不同的抗原性。虽然酶的抗原性无法改变，但通过一定的制备使用户尽量减少与酶的直接接触则是能够办到的。大多数过敏反应都是因与尘埃形式的酶直接接触引起的，因此只要将这些酶包埋到一种惰性载体中，就可以避免这一问题的发生。实际上，液态酶制品用得更广。

现在认为，酶的催化活性对人健康的直接影响不大，纯酶一般无毒。

酶制品中存在毒素主要与两个生产环节有关，一是发酵培养基中可能存在有毒的物质，二是由于大多数酶的纯化过程比较粗糙，培养基中的有毒物质被混入终产品中。因此，要保证产品无毒性，必须指定使用食品级或饲料级的原料，并且对整个系统的微生物污染问题进行定期检查。

对于真菌酶人们主要担心在生产菌株中有真菌毒素存在。近二十五年来，人们对许多真菌产生的有毒代谢物（即真菌毒素）有了越来越多的了解。现在，所有真菌酶的样品都要进行特定毒素的测定。许多真菌毒素对实验生物表现有致癌作用、雌性激素作用、诱变作用或致畸作用。由于有关人对低浓度真菌毒素毒性反应的资料很少，因此很难对真菌毒素的危害性作出定量估价。尽管如此，只要产品检测出真菌毒素就不能使用。

用于酶生产的微生物可以分成三大类。不同类的微生物在用于酶生产之前需要进行不同等级的毒性试验（表24）。A类微生物是传统食品和食品加工过程中长期使用的微生物，这类微生物不需要进行毒理学试验。B类微生物是食品中存在的被认为无害的杂菌，这类微生物只需要进行短期的毒性试验。C类微生物是除A类和B类微生物以外的所有其它微生物，对这类微生物需要进行广泛的毒理学研究，包括几种动物的长期饲喂试验。

厂家必须对酶产品的安全性负责。新产品必须经过有关部门的允许方可生产。一些国家和国际组织已经对几种酶作了产品说明和介绍。

总之，酶产品必须均匀一致，安全可靠。满足这些要求是厂家应尽的职责。

表 24 食品酶的安全试验(根据食用微生物酶产生菌分类协会拟定)

类 型	A类微生物 (传统用于食品或食品加工的微生物)	B类微生物 (食品中存在的公认无害的微生物)	C类微生物 (A与B类外的其它微生物)
致毒性试验	一般不需要试验		×
急性口服毒性试验 (小鼠或大鼠)		×	×
亚急性口服毒性试验 (大鼠4星期)		×	×
三个月口服毒性试验 (大鼠)		×	×
离体诱变性试验		×	×
致畸性(大鼠)试验; 活体诱变性试验 (小鼠和仓鼠)			(×)• (×)•
对成品食物进行毒性研究			(×)•
致癌性(大鼠)试验 育性与繁殖试验			(×)• (×)•

(×表示要进行;•表示只在特殊情况下进行)

4.5 固定化酶

使用游离酶的最大缺点是游离酶在操作条件下不够稳定,并且作为水溶性游离分子,它们很难与底物及产物分开,因此难以反复利用。

近年来,人们试图通过酶的固定化过程来克服游离酶的以上缺点。酶的固定化一般指将酶从水溶性和可移动状态转变为非水溶性固定状态的过程。酶固定化后可以防止酶在反

应物中扩散，并且有助于利用简单的固液相分离技术从产物流中对酶进行回收。这样，反应产物可以不带酶，而且酶可以重复使用。固定化酶非常适合连续操作的生物反应器使用。

现已发展了一百多种固定化技术，这些技术可区分为不同类别。实际上，酶的固定化方法可以归纳为以下几种：

(a) 通过共价键使酶与非水溶性物质表面联结；(b) 用适当试剂使酶交联成不溶性颗粒；(c) 将酶包埋在可透过酶、底物和产物的基质或凝胶上；(d) 使酶胶囊化；(e) 酶吸附在固态载体表面。图22是酶固定化方法示意图。表25列出了可用于酶固定化的方法。

4.5.1 酶与固态载体共价偶联法 用于共价偶联的载体材料很多，其中包括多孔玻璃和陶瓷（适用于淀粉转葡萄糖苷酶），人工合成的高聚物（适用于胰蛋白酶），纤维素（适用于天冬酰胺酶和淀粉酶），尼龙（适用于脲酶）和矾土（适用于葡萄糖氧化酶）等。用来自肽和蛋白质化学的各种方法解决酶与载体的附着问题。形成共价键的优点是酶与载体的结合不会因pH、离子强度和底物的影响造成酶从载体上脱落，缺点是形成共价键时发生的化学反应可能会导致酶部分（甚至全部）失去活性。共价键连接的方法很多，但作为固定化过程起码应包括两个步骤，即载体的活化和酶的联结。实际上可参与形成化学键的基团有氨基、亚氨基、酰胺基、羧基、羰基、硫醇基、甲基硫醇基、guanidyl基、咪唑基和酚基。

4.5.2 凝胶包埋法 用于酶固定化的方法原则上应该非常温和，不破坏酶的活性。在凝胶形成前将酶加入到单体溶液中，然后，通过改变温度或加入某种可诱导结胶的化学

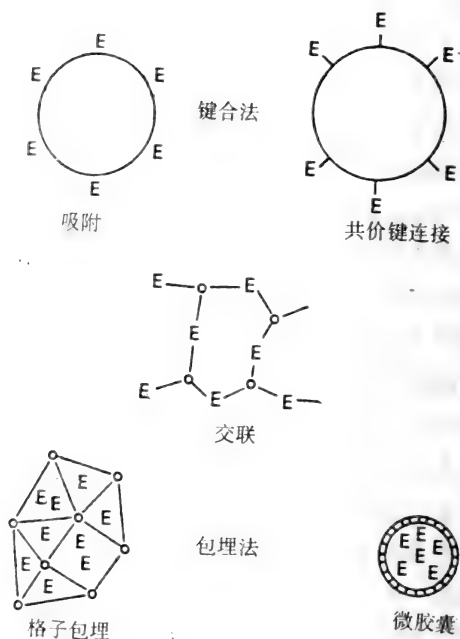


图22 固定化方法示意图 (E表示酶分子)

药物，以促进凝胶形成，从而使酶包围在凝胶格子中。这种固定化方法的优点是酶能够保持原有状态。它们的活性部位、基团和酶分子，不会因化学键的形成导致闭锁的危险。这种方法的缺点是酸会通过微孔不断渗出而造成酶的损失，而且由于底物与产物扩散受阻（高分子量化合物尤其如此），酶反应速度可能受到影响。

表 25 固定化方法

共价结合法

- 羟基异丁烯酸(戊二醛)
- 羧甲基纤维素(碳化二亚胺)

包埋法

- | | |
|--------|-----------|
| 聚丙烯酰胺 | 胶原蛋白(明胶剂) |
| 藻酸盐 | 聚苯乙烯 |
| 三醋酸纤维素 | 尿烷 |
| 琼脂 | 尼龙(微胶囊) |
| 角叉藻聚糖 | |
| 脱乙酰壳多糖 | |

吸附法

- | | |
|----------------------|----------|
| 阴离子交换树脂 | 离子交换纤维素 |
| Dowex 1(离子交换树脂的商品名称) | 聚氯乙烯与多孔砖 |
| DEAE-纤维素 | |
| 交联果胶酸盐 | |
| 金属氧化物 | |
| 生物吸附:伴刀豆球蛋白A | |

交联法

- 戊二醛
- 清蛋白和戊二醛
- 明胶和戊二醛

可用于包埋酶的物质有: 硅胶、硅橡胶、淀粉和聚丙烯酰胺等, 其中聚丙烯酰胺使用最广。用聚丙烯酰胺作包埋物的酶有: 天冬酰胺酶、葡萄糖异构酶、过氧化物酶和许多其它酶。

4.5.3 酶胶囊法 这种方法是将酶包在半透膜内形成胶囊, 实际上是另一种包埋法。半透膜只允许小分子的底物和产物通过, 而酶和其它大分子则不能通过。制备半透膜的物质有: 火棉胶(用于过氧化氢酶、L-天冬酰胺酶)、纤

维生素衍生物（用于脂酶）、聚苯乙烯（用于过氧化氢酶）和最常使用的尼龙（用于胰蛋白酶、脲酶）。这些物质可制成球状半透性薄膜将酶包于其内形成微型胶囊。

4.5.4 固体表面吸附法 吸附法最诱人的特点是方法简便。吸附过程不发生任何反应，酶本身无改变。最常用的吸附剂包括许多有机物和无机物，如：矾土（适用于酰化氨基酸水解酶、淀粉酶）、纤维素（适用于纤维素酶）、粘土（适用于过氧化物酶）、玻璃（适用于脲酶）、羟磷灰石（适用于NAD焦磷酸化酶）、碳和各种硅质材料（适用于淀粉酶）。离子交换剂能够吸附大多数蛋白质，因此也被广泛用于酶的固定化过程。酶的吸附结合是可逆的，当有底物存在或离子强度增大时，酶可以解析下来。

4.5.5 多功能团试剂交联法 这种方法在没有固态支承物情况下进行反应，可使酶分子形成三维网络结构。实际上，用得较多的方法是首先将酶吸附在适当载体上然后进行交联。最常使用的交联剂有戊二醛、脂族二胺、己二酰二甲酯和辛亚胺二甲酯等。其中以戊二醛最重要。交联可以在分子间发生，也可以在分子内发生（分子间交联产生不溶于水的聚合物）。通过共聚作用（即通过共价键形成多聚体），酶成为固定化状态。共聚作用常用马来酐和乙烯进行。一种使用较广的方法是首先将酶吸附在赛璐玢膜上，然后用戊二醛交联。应用这种方法进行固定化的酶有淀粉酶、过氧化物酶和葡萄糖氧化酶等。与包埋法和微胶囊法一样，用这些衍生方法制成的固定化酶对大分子底物很难发生催化作用，甚至无作用。

4.5.6 商品化的固定化酶 酶固定化方法的选择主要取决于这种方法如何影响酶的催化活性。共价连接法与交联

法均在酶和载体间形成很强的化学键。这些方法难度较大，成本也较高，并且可能导致酶活性的明显下降，甚至发生活性中心的连结（表26）。相对来说，吸附和凝胶包埋固定化方法比较简单而有效，但由于酶与载体之间没有很强的键连结，常常从载体上脱开。这个问题可以通过将吸附或包埋后的酶用戊二醛加以交联而得到基本解决。

表 26 固定化酶技术的优缺点

方法	优 点	缺 点
共价结合法	不受培养基的pH和离子强度及底物浓度影响	活性部位可能被改变；工艺成本高
共价交联法	酶被强烈束缚，不会丧失	制备时酶活性受影响而下降；对大分子底物无效；载体不能再生
吸附法	方法简便，对酶无影响；载体可以再生；技术成本低	离子强度改变时可能引起解吸；酶会受到微生物或蛋白酶的攻击。
包埋法	酶不发生化学的改变	扩散效应影响底物传送到酶的活性部位，同时影响产物从酶的活性部位输出；制备困难、常导致酶失活；由于孔径分布使酶不断损失；对大分子底物无效；酶不受微生物和蛋白水解作用

在实验室水平上用固定化取得成功的酶很多，但放大到工业生产水平则成效寥寥。其中有二个商业上取得成功的例子：应用于食品工业的葡萄糖异构酶和应用于抗生素工业的青霉素酰基转移酶。

葡萄糖异构酶可催化葡萄糖部分转化为果糖，并由此产

生出价格低廉的甜味剂。世界上通常使用的甜味剂是用甘蔗和甜菜生产蔗糖提供的。这种传统的生产模式终将由于葡萄糖异构酶的利用而改变。目前大批量生产果糖甜味剂的公司至少有五个，这些公司利用了不同来源的微生物，包括链霉菌、凝固芽胞杆菌和米苏里游动放线菌。实际上，要使酶具有最佳的生产活力必须提供高浓度葡萄糖的底物。由廉价的淀粉产生的糖浆作为底物加入反应器时要求葡萄糖浓度为40—50%。连续泵送操作时可能产生粘滞度的问题，但通过高温（60℃）和高pH值（7.8—8.5）操作，这种问题可以得到解决。为了分离果糖和葡萄糖以产生果糖含量为55%或更高的高果糖浆，现已研制成功了工业生产规模的层析方法。现在每年要用数千吨的葡萄糖异构酶生产数百万吨的果糖糖浆。表27列出了该过程的有关数据。工业上使用的葡萄糖异构酶有两种类型，一种是固定化酶形式，另一种是固定化细胞形式（表28）。

表 27 葡萄糖异构酶和青霉素酰基转移酶的典型工艺数据

葡萄糖异构酶		青霉素酰基转移酶
酶的形式	刚性颗粒	刚性颗粒或葡聚糖/ Sephadex固定
反应器	柱式(填充床)	柱式
原料	40—50w/w的右旋糖 95%	4—15%w/w的青霉素或头 孢霉素(取决于酶的制备)
添加剂	MgSO ₄	——
温度	58—65℃	35—40℃
入口pH	7.5—8.5	7.0—8.0(取决于酶的来源)
运转寿命	1000—2000小时	2000—4000小时
生产能力	生产42%果糖 2000—4000kg/kg酶	1000—2000kg/kg酶

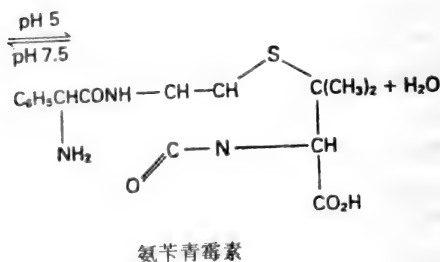
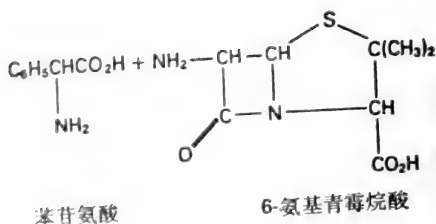
表 28 固定化的葡萄糖异构酶

酶的来源	固定化方法	公司名称
白色链霉菌	细胞内温度固定	Agency of Industrial Science and Technology(工业科技处)
链霉菌某菌种*	吸附在DEAE-纤维素上	Standard brands(标准商标公司)
节杆菌属	用絮凝剂凝结	Reynolds Tobacco Co.(Reynolds烟草公司)
凝结芽孢杆菌	用戊二醛交联	Novo Industri A/S
暗色产色链霉菌*	用酚醛树脂吸附	Kyowa Hakko Kogyo
链霉菌某菌种*	用专门的多孔氧化铝吸附	Corning Glass works
暗色产色链霉菌	用专门的离子交换树脂吸附	Misubishi chemical Industries (日本三菱化工)
米苏里游动放线菌	用明胶包埋然后用戊二醛交联	Gist-Brocades NV
橄榄色链霉菌	用戊二醛交联	Miles Laboratories Inc.
链霉菌某菌种*	用纤维素包埋	Snamprogettie SPA

• 固定化酶，其它为固定化细胞

工业上第二个重要的固定化酶是青霉素酰基转移酶（由大肠杆菌获得）。这种酶可催化天然青霉素侧键脱去乙酰基形成6-氨基青霉素酸（6-APA）。用6-APA可以合成几种有重要医用价值的半合成抗生素。如重要的抗生素氨苄青霉素，就是用苯甘氨酸和6-APA合成的。

每年生产的6-APA至少达3 500吨，但使用的酶制剂只需30吨。生产过程采用颗粒状酶在固定床柱反应器中进行。表27可见该过程的有关数据。



4.6 固定化酶的性质

酶的固定化可能导致酶性质的明显改变。这些改变可能由以下因素引起：

①酶结构发生的化学或构象的变化，②固定化酶催化作用的异质性，③所有载体的理化性质。

提高酶的稳定性是生物工程中最棘手的问题之一。酶在反应器系统中所处的环境比通常活体环境要恶劣得多。尤其是它们面临着较高的温度和具有抑制性的杂质状态，并且不具备活细胞所特有的保护性平衡环境。虽然酶化学发展了许

多年，但对酶失活的机制却了解甚少。

虽然已有一些用固定化方法提高酶稳定性的例子，但一般说来，固定化并不是一种提高酶稳定性的方法。象其它随机处理一样，固定化可能提高、可能降低，也可能不影响酶的稳定性。

热是反应器中酶失活的主要原因之一。热使酶失去活性无疑是由于蛋白质分子结构发生改变的结果。酶通过共价键与固态载体联结后，蛋白质分子变得更僵硬，展开的机会减少，因此失活的可能性小得多。蛋白质结构的展开是各种酶失活模型的一种普通特征，它可由有机溶剂、变性剂和pH的变化所引起。所以说通过与固态载体的多点联结使酶固定化可为提高酶稳定性提供一个基本的方法。

酶的固定化往往可导致酶的某些功能的改变。酶以游离态发生作用时，系统是匀质的，加工底物、产物活化剂、抑制剂和辅助因子等所有组分都是匀质的。可是，酶固定化后，由于系统的理化性质使得固定化酶与液相之间产生分界面，从而成为一个非匀质的系统。由此可见，与游离态酶相比，固定化酶的某些特性将发生变化。同时底物向催化剂移动会受到扩散阻力的影响。底物必须从大量液体穿过水的界面到达固定化酶，最后进入到固定化酶颗粒内（这种颗粒可能是凝胶、微型胶囊或微孔纤维），因此扩散受到限制。

固定化酶既可用于对现有工艺过程的改造，也可用于创造新的工艺过程。目前，固定化酶在工业生产实践中的利用还很有限。在1983年，用固定化系统进行的工业化操作局限于：7种葡萄糖异构酶、4种青霉素酰胺酶，3种氨基酸酰基转移酶的乳糖酶、2种葡萄糖淀粉酶、1种天冬氨酸酶和1种延胡索酸酶。可以预见，固定化系统将在分析和医学应用领

域得到进一步利用。这是由于产生新的想法而不是对改进旧方法所导致的结果。

为什么迄今固定化酶成功的例子很少？原则上说，其原因主要是由于以下一些因素综合作用而引起的：

(a) 许多工业过程使用的可溶性的酶比较便宜；

(b) 向现有过程引进新设备需要高额投资；

(c) 在固定化系统的实践中，整个操作的经济性与工厂设计的等级令人失望。

可以看到，酶技术在工业上的进一步应用将包括两部分内容，一部分正在应用或接近应用，另一部分则需要作大量研究工作才能在技术上和经济上变得切实可行。

这种第二代的酶工程在生物工程的众多分支领域中无疑是最激动人心和最显示智力需要的领域之一（表29）。

表 29 第二代酶工程

现 状	现有的酶工程知识；分子生物学、酶学、物理化学基础知识		
研究目标	<div style="text-align: center;">↓</div> 在技术上利用较复杂的酶反应进行人工合成，包括利用多酶系统(包括辅助因子再生系统)； 稳定化亚细胞结构； 固定化完整细胞以及酶在有机溶剂中的使用		
需要的专门知识	有机与多聚体化学 生物化学 微生物学 遗传工程学	<div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 0 10px;"> 生化工程 电 化 学 生物物理学 </div>	
研究的影响	<div style="text-align: center;">↓</div> 新的医学应用； 生物化学修复术 (如人工肝功能)	<div style="text-align: center;">↓</div> 新的分析应用； 酶电极用于医学 与工业(如生物 反应器的在线控 制、人工肾)	<div style="text-align: center;">↓</div> 新的工业应用 精密化学品、医 药、食品

4.7 细胞的固定化

一般说来，细胞和细胞器是进行生物化学合成的最小单位，因为它们具有辅酶再生系统并且具有有条不紊的多酶系列等等。奇怪的是，微生物细胞固定化技术主要是在酶固定化技术之后发展起来的。然而，实际上，酶的固定化技术主要涉及催化单步反应的单酶系统（如氧化还原反应，异构反应、水解反应等）。固定化酶除了用于简单的一步反应外，其它企图均因以下原因而受到严重的限制：（a）缺乏切实可行的辅酶再生技术；（b）进行多步酶促反应时需要将酶分子有规律地排列，这样做缺乏有效的方法。用固定化细胞能否克服固定化酶的这些不足呢？细胞固定化后仍然能操纵细胞的总代谢吗？

近十年来，细胞与细胞器固定化技术发展很快。固定化制备范围包括细胞碎片、细胞器、细胞匀浆、死细胞、渗透化处理的细胞、静止细胞、饥饿细胞和细胞混合培养物。这些制备物多数被用作生物催化剂，但最近一些研究将它们用作亲和吸附剂。现在可以使几乎所有的细胞结构固定化并且能使细胞保持存活。细胞的固定化方法并非完美无暇。例如，向密集细胞制备物提供充足的氧气以及细胞在载体结构内部进行生长均增加了困难，甚至可能改变代谢模式。

固定化细胞技术潜力很大，与固定化酶相比，无疑有更广阔的前景。目前，有的固定化细胞技术已经在工业上得到应用。较大比例的高果糖浆是用固定化的凝固芽孢杆菌细胞生产的。每年生产的天冬氨酸和苹果酸也有很大吨位量。在微型载体上生长的锚地依赖性哺乳动物细胞正在用于疫苗、

酶、激素、抗体和干扰素的生产，这是一项杰出而重要的固定化细胞技术。哺乳动物细胞培养技术问题已在第三章中进行了较详细的论述。

4.7.1 人工固定化 前面提到的用于酶固定化的方法同样可用于整个细胞的固定化。然而，在微生物和动植物细胞固定化方面实际所采用的方法主要是细胞的凝胶包埋法和吸附法。采用这些方法时必须防止必要的代谢活动被破坏。这些方法的好处是生物催化剂与产物容易分开，并且酶的稳定性得到改善。

在某些情况下，使用的细胞可能已经死亡但仍保持有必要的酶活性。为了使某些分子能够较容易地通过细胞膜进出细胞，可以对细胞进行适当的处理，即渗透化处理。处理后，细胞膜上形成小孔，但酶内容物 (enzyme package) 保持不变。细胞处理可以在固定化前，也可在固定化后进行。实际上，许多反应是用固定化活细胞进行的，这些活细胞可以是静止细胞，也可以是在凝胶基质中活跃生长的细胞。后者可被看成是一种可更新或可以自我增殖的生物催化剂。这种细胞存在于特定的空间区域，因此可以减少作用区域之外不利环境因子的干扰。

固定化细胞技术的主要优点之一是细胞能够再利用。它为分批过程连续化提供了手段，并且有利于提高细胞的群体密度从而加快反应速度。载体使细胞保持在反应器中，因此稀释速率可以超过细胞的最高生长比速 ($\mu_{m,x}$) (从而解决了连续系统的细胞冲出问题)。微生物细胞能够再生许多生物合成反应中必需的辅助因子。游离酶则需要提供辅助因子，而辅助因子的成本是非常昂贵的。相比之下，不能不说这是固定化细胞的一大优点。与游离酶和固定化酶相比，利用完

整的细胞更有利于获得多酶反应的空间结构。

但是，利用固定化的完整细胞也有些缺点。细胞中含有大量有催化活性的酶，这些酶有时催化产生我们不希望发生的副反应。对于有些不希望的副反应目前可以通过加热、加碱或加胆汁盐等简单处理来解决。固定化还可能使所需的催化能力下降，这个问题主要通过对合适的固定化方法的选择来减少。催化活性下降可能是由于扩散障碍的存在，使底物进入与产物排出受到妨碍所致。利用固定化的静止细胞或生长细胞时，由于维持细胞生长要消耗作为碳源和能源的底物，因此产物的产量可能降低；利用固定化的生长细胞时，细胞从凝胶基质中漏出还可能导致产品的污染。

4.7.2 固定化酶与固定化细胞的生物反应器 用于发酵过程的生物反应器的设计和操作已在前面第三章中介绍过了，其中有的也可用于固定化酶和细胞。但是，一般来说，用于发酵的反应类型与用于固定化酶和细胞的反应类型是根本不同的。在设计固定化过程中，首先要考虑采用的操作是分批的还是连续的。在大多数情况下都选用连续操作。

在选择生物反应器时，动力学特性的考虑很重要。对于大多数类型的反应来说，填充床反应器在动力学特性上一般优于连续搅拌罐反应器。由于操作时底物浓度的不同，连续搅拌式反应器的平均反应速度低于填充床反应器。但是，对于需要高速输氧和需要通过加酸加碱控制pH值的反应，搅拌式反应器更合适。此外，对于加工液的体积也应加以考虑。就所需化合物的单位产量而言，采用连续法时发酵液的体积要小得多。

固定化酶和固定化细胞技术通用的生物反应器类型如图23所示。其中以填充床反应器和流化床反应器最重要。连续填

充床反应器使用很广。这种反应器根据底物的流向可有三种类型：下流式、上流式和循环流式。

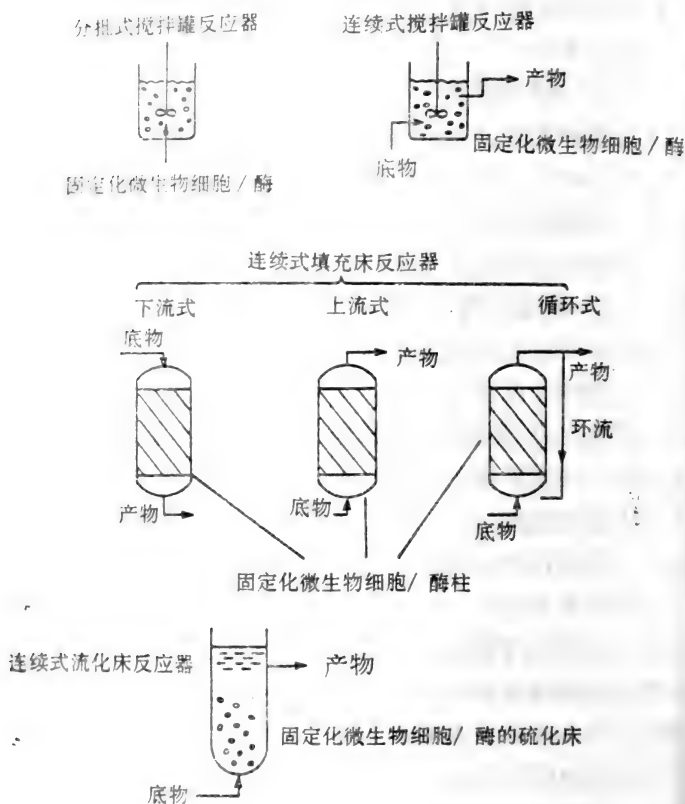


图23 固定化细胞/酶生物反应器示意图

如果反应速度受底物供给速度的影响，可选用循环式。由于基质下流会产生对床的压力，工业生产中常选用上流式。同样，如果反应期间有气体释放也最好采用上流式。固定化生长细胞系统可能会出现一些问题，因为释放出的细胞可能会造成隙间（颗粒间的空间）堵塞，使底物形成沟流。

在流化床中，当穿过床的压力下降等于床重时，颗粒被保持悬浮状态。减压使床堵塞，增压则导致颗粒从系统流失。

如果连续式反应器系统涉及粘度很大的底物溶液、气态基质或气态产物，则利用流化床反应器有特殊价值。固定化系统的颗粒大小对于形成光滑的流化床可能是重要的。

4.7.3 自然粘结固定化 在这种固定化过程中，细胞通过自然粘结机制附着到物体的表面，然后形成膜状生长物。利用这一固定化技术的反应器有：（a）固定床反应器，如污水处理过程中使用的渗滤池或滴滤池，其上均有菌膜生长。

（b）转盘式反应器或生物转盘：微生物或动物细胞在部分浸没的转盘上生长，形成膜状生长物，转盘通过营养槽转动时，膜状生长物交替地进入液体和空气；（c）搅拌罐或流化床反应器：膜状生长物生长在它们的小载体颗粒上，由此为生物体的繁殖提供了广阔的表面积。这些颗粒间的物理接触或磨蚀作用排除了过量的表面生长，使膜的厚度保持相对恒定。这些颗粒可能有多种形状、大小、多孔性和密度，可以供多种类型的细胞定居繁殖。

在不需要膜状生长物的地方，例如传统的生物反应器中（要求细胞只在搅拌的液体中生长），有时也会出现膜状生长物现象。许多微生物在液体反应器中难以培养，因为它们

很容易附着在反应器壁、叶轮和探针入口处。这样的生长可能导致反应器下游设备性能下降，并且会加快腐蚀过程。膜状生长物系统有很多与其它固定化技术类似的优点，包括可防止细胞冲出；细胞生产与生物催化过程分开进行；在不同底物喂给速率下生物反应器保持稳定；底物转化率高和产品更容易回收等。主要缺点是膜状生长物的异质性以及底物和气体扩散等特殊问题。

膜的厚度是影响这些细胞薄膜生物学活性的重要因素。已经证明，只有在膜的外层70—100 μm 内菌膜才能吸收到底物。并且因底物浓度的不同，需氧层的厚度在50—150 μm 之间。

本章提要

酶是特异性很强的生物催化剂，它可以在温和的水溶液生理条件下以高的转化率行使功能。酶不但可以在所有活的生物体内自然产生，而且可以以胞外酶的形式由生物体本能地分泌到环境中。目前，已经分离出2000多种酶，但获得明显商业重要性的酶只有约20种，并且这些酶大多数是水解酶，如淀粉酶、蛋白酶、果胶酶和纤维素酶。其它重要的酶有葡萄糖异构酶和葡萄糖氧化酶。

大多数重要的商品酶是用有限数目的微生物生产的，这些微生物长期以来作为食品和饮料生产菌被人们所接受。新的酶产品受到安全条例的严格限制。

在工业上，微生物的胞外酶和胞内酶采用液下深罐发酵法和固体底物发酵技术生产。大多数液体培养基是用几种复杂的不定物混合而成，如糖浆、淀粉水解液、玉米浆和酵母提取液等。酶的生产可以通过环境与遗传操作加以控制。

酶的使用形态有水溶性游离态和固定化状态两种。固定

化可以防止酶在反应混合物中扩散，并且有利于从产物流中对酶进行回收。在连续操作型生物反应器中使用固定化酶非常有利。酶的固定化方法有共价偶联、凝胶包埋、胶囊化、固体表面吸附和多功能试剂交联等。目前，固定化酶只在有限的工业部门中得到了利用，但在医学和分析方面将会有进一步的应用。

完整细胞的固定化技术利用了来自酶研究的原理，现已得到广泛发展。这些技术可以对单酶和多酶系统进行利用，并且可以避免冗繁的酶纯化手续。实际固定化的细胞可以是死细胞、静止细胞和活跃生长的细胞，并且可以进行适当处理，使特定分子容易通过细胞膜进出。这种“渗透化过程”包括在细胞膜上形成小孔，而酶则仍保持在细胞内。固定化活细胞的辅助因子再生作用，在生产上是个重要的优点。与游离酶和固定化酶相比，用完整细胞进行多酶反应更加有利。

固定化酶和细胞最通用的反应器系统是填充床反应器和流化床反应器。

细胞还可以通过自然粘结机制贴附到物体表面，并且随后形成生长物膜从而被固定化。应用这些技术的例子有：渗滤池或滴滤池，转盘反应器或生物转盘以及搅拌罐和流化床反应器中载体颗粒上的膜状生长物等。

第五章 出料加工

出料加工是指从发酵过程中分离和提纯一种或多种所需产物的过程。出料加工过程的设计与有效实施是使所需产品进入商业利用的极其重要的一步。在这一过程中,要尽量争取减少所需产物的任何不必要的损失。在生物工程中,出料加工过程是魅力最小的一个环节,然而其费用却占据了生产总成本的主要部分,相当于总成本减去购买材料的成本后的40% (即增值因子)。随着优良生物的使用以及培养基设计和反应器控制的改善,以发酵为基础的生产效率在不断提高。与此同时,如果不相应地改进产物分离与纯化过程的效率与方式,出料加工过程的增值因子将会更大。

在一般的生物工程过程中,生物催化剂与有机底物反应后,除产生所需产物外,还产生数量不等的不需要的副产物。在不同的工艺过程中,发酵底物中碳素的最终去向不尽相同。在大多数以生物体为基础的工艺过程中,碳素被大部分转化为生物物质和呼出的二氧化碳,一般只有少量的碳素被转化为所需产物。表30列出了一些典型产物在工业发酵过程终点时的浓度。

实际上,在大多数生物工程过程中,20—50%的碳底物被转化为 CO_2 和其它气体。收集发酵气体(特别是 CO_2)可作为工艺过程中的一项重要的额外收入。

大多数生物工程过程是在大容量的液体中生产低浓度的所需产物。在现行的出料加工过程中,大量不需要的副产物

表 30 发酵过程结束时的产物浓度示例

产 物	浓度(克/升)
维生素B ₁₂	0.02
大多数酶	1—5
抗 生 素	10—30
核 黄 素	10—15
脂 类	10—30
单细胞蛋白	30—50
有 机 酸	40—100
乙 醇	70—120

最后需作为废物处理。使用后的发酵液常被视为废水。现在，迫切需要将这种有机混合物作为进一步加工的底物或其它有用产物的直接来源。在发酵过程中排放的废液量可能大得惊人。一个大的SCP工厂排放的废液量相当于一个约20万人口的城市排放的总污水量。可见，生物工程要想在将来与利用有机物质生产有用商品的化学加工业展开竞争并取得成功，必须对这一严重浪费的环节进行大的改革。

在第一章中，对生物工程的操作规模进行了概括。本章将主要阐述小规模操作的工艺过程，因为小规模操作的工艺过程代表了目前生物工程获利的主要部分。同时，对于大中规模操作的工艺过程也将作适当考虑，因为在这类工艺过程中，要想与化学加工业展开成功的竞争，必须对出料加工过程进行大的改造。

原则上，从大量液体中有效分离低浓度产物的出料加工过程，其中心环节是（a）处理发酵液实现液相与固相的分离，和（b）对来自液相的产物进行浓缩与提纯。

正在或有可能由生物工程过程生产，并需要经过一定程

度出料加工的产品范围列于表31。

表 31 目前和将来的发酵产品

醇类	氨基酸类
乙 醇	色 氨 酸
n-丁 醇	苏 氨 酸
异 丙 醇	蛋 氨 酸
甘醇(乙二醇、丙二醇、丁 二醇)	天冬氨酸
丙三醇	苯丙氨酸
	aspartame(一种二肽)
有机酸类	抗生素类
醋酸(和醋)	青 霉 素
丙 酸	头孢霉素
丁 酸	红 霉 素
延胡索酸	四 环 素
苹 果 酸	塔 罗 素
乳 酸	林肯霉素
葡萄糖酸	杆 菌 肽
柠 檬 酸	庆大霉素
肽类、蛋白质类	杂 类
干 扰 素	丙 酮
工 业 酶	核 黄 素
生物杀虫剂类	
细 菌	
病 毒	

5.1 发酵液处理原则

发酵液通常是稀释的液态系统。为了避免产物理化性质的改变和防止外来微生物对液体造成次级污染，有必要尽快

增加产物浓度。

某种生物工艺过程中所含的细胞或生物量组分可以是十分复杂的，它们因使用的细胞类型的不同而有着本质的差异。生物量通常是一种可压缩的具有很大粘性的胶质固体，并且可以形成粘滞的浆液。生物工艺过程的生物量组分可以是所需的产物（SCP），可以是产物的贮藏库（如胞内酶），也可以是不再需要的副产物或废物。因此，在考虑生物量分离的策略时，以上特点将决定方法的选择。

发酵液一旦离开了能控制的生物反应器环境后，可能变得很不稳定。许多发酵过程在高度强制的通气条件下进行。当发酵液脱离这种有利的环境时，可能出现部分的厌氧生活，使系统发生急剧的变化。这时，细胞解体，产物被呼吸利用，不稳定的产物遭到破坏。

杂菌污染问题也是大多数发酵系统面临的严重问题，因为大多数用过的发酵液仍含有适合一般杂菌利用的丰富营养。杂菌的存在可能破坏产物或使发酵液变性。杂菌污染受温度影响很大。加工小容量产品（如酶、抗生素）时，可以将温度由操作温度 30°C 迅速降到 5°C 。但是，对于大容量产品的加工应则尽量避免降温，因为降温过程花费很大。建立大型冷冻厂的投资费是很高的，这样做会严重影响总的生产成本。

那么，制订有效初级出料加工计划时应该考虑的主要准则是什么呢？出料加工一般是分多步进行的，应考虑以下的全部或部分基本原则：

（1）所有过程应该以最大程度地回收所需产物和尽量减少不需要的化合物存在为目的。

（2）由于要快速处理大量出料，因此加工设备应坚实

可靠。与化学过程明显不同的是，生物学过程带有许多在化学上与所需产物十分不同的其它物质，而且可能带有杂菌。因此，开始用于粗分离的设备不应太敏感，应允许产物变异控制在一定限度内。工艺过程需要多少步骤是很重要的，因为投资费用和操作费用往往与步骤的多少成正比。因此，加工过程的步骤数应尽量减少到最低限度。

(3) 使用的方法必须能够使回收过程最后液体阶段的液体体积比开始的发酵液体积大为减少。在某些情况下，体积的减少可达1000:1。

(4) 出料加工过程最后产生的废液应便于循环利用或作常规的污水处理。虽然废液中仍有相当数量未用完的养分，但它们只有在大规模的操作中才能被再度利用或循环利用。生物反应器废液的循环利用还只是在一些SCP和酒精生产过程中获得了经济上的成功。大多数情况是，固体废物被焚化，液体废物则被作为污水处理。

(5) 对于所有的工艺过程而言，发酵液一脱离反应器应立即进行出料加工处理。任何延缓和停顿不但需要昂贵的储留设备而且发酵液中的产物很可能变质。小规模操作时，发酵液可冷却处理，但对于某些过程（如SCP生产）中遇到的大容量来说，其能耗是不允许的。

(6) 由于大多数生物工艺过程的产物浓度很低，在初级回收阶段单位容量发酵液的处理费用将代表终产品成本的一个重要部分。对于高价值低容量的产品来说，高的能量输入是可行的，但对于低价值高容量的产品却是行不通的。随着工艺规模的扩大，由于增强絮凝作用、pH控制和助滤作用的添加剂，费用将变得可观起来。

初级出料加工过程可利用多种方法进行。方法的选择主

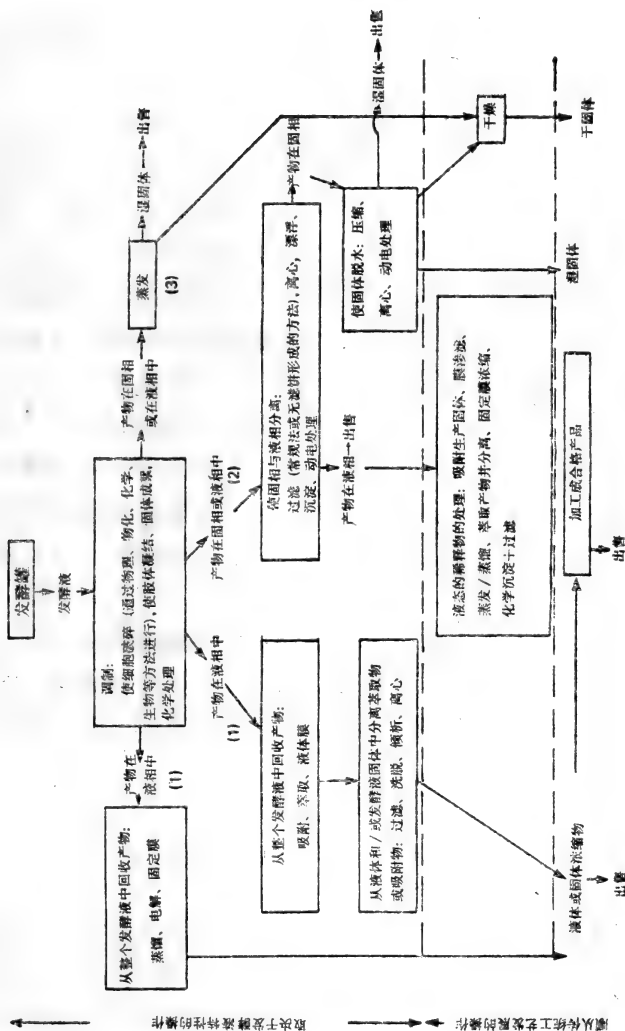


图24 经过初级回收阶段的产品路线及其可用的单元操作

要取决于产物的理化特性。产物初级回收的基本途径如图2₄所示。

途径(1)是从未过滤的发酵液中分离产品的过程。在现行的工业实践中,这方面的例子很少,其中包括动力酒精工艺和某些抗生素(如链霉素)的直接吸附。大多数工艺过程采用途径(2),它包括固、液相分离和产物的相继加工。利用这一途径的有:青霉素的提取、传统酒精工艺和以固相物(如SCP、胞内产物)为基本产物或固相物中含有基本产物的过程,当然还有所有工艺过程中最大的过程——污水处理。途径(3)现在很少使用,它包括直接蒸发过程。

除直接蒸发外,与发酵液处理有关的主要问题将取决于发酵液的物理和物化性质,无论在发酵液脱离反应器时,还是在发酵液经过絮凝作用或细胞破裂过程等处理后都是如此。

发酵液的初级处理,以及随后从固相或液相中分离产物的原理与方法,将专门以途径(2)为例作简单介绍。有关这些方面的详细内容请参阅Atkinson和Mavituna(1983)的权威性著述。

5.2 发酵液处理技术

调制处理 调制处理即反应器内含物的预处理,通常是改善发酵液的相继处理特性而设计的。典型的调制过程可通过细胞或固体的絮凝作用、凝胶的凝固作用或在必要时打破细胞释放细胞内产物(如酶)等方式进行。对某些细菌来说,老化往往可以诱发絮凝作用。但一般来说,絮凝作用可通过加入化学絮凝剂,如氯化钙或聚电解质,或通过热处理

和改变pH值的方法来实现。所有这些方法都能促使较大的固体团粒形成。这些团粒具有较硬质的结构，便于分离和脱水，而且不会形成能使滤器底垫迅速阻塞的那种不透水的膜。

调制过程一旦成功地用于特定的出料加工过程，它便能：（1）增加固液相分离阶段的物料通过量，（2）控制整个发酵液提取过程中的固体的动向和（3）减少整个发酵液吸附过程中的污物堵塞。

细胞破裂可以是出料加工过程的一个必要的早期步骤。它是指用机械、化学、物理化学和微生物学方法打破细胞壁和细胞膜，使产物从细胞中释放出来的过程。细胞破裂技术使细胞内物质释放到液相中成为溶质或胶质。这样释放出来的物质具有比原来完整细胞体积小得多的堆积体积，因此减少了干燥费用。此外，发酵液中固体的物理性质将被改变，可增加表观密度和防止形成不透水的填充层将滤器阻塞。

图25给出了各种可资利用的细胞破裂技术。虽然可用于实验室规模的破裂技术很多，但真正适合大规模回收过程应用的却很少。大规模细胞破裂方法的选择取决于：（1）细胞对破裂处理的敏感性，（2）产物特有的稳定性（3）从细胞碎片中分离产物的难易程度，（4）方法的速度和（5）工艺成本。

机械破裂法主要有：借助于高压匀化作用的液体剪切破裂法和包括碾磨过程在内的固体剪切破裂法。液体剪切破裂法的匀化过程是通过碰撞、剪切、空化和高速作用的综合效应来实现的。固体剪切破裂法是将细胞悬液和固体颗粒（如珠子或球粒）混合在一起进行强力搅拌。

细胞的化学裂解和酶解法已在各种操作水平下使用。碱

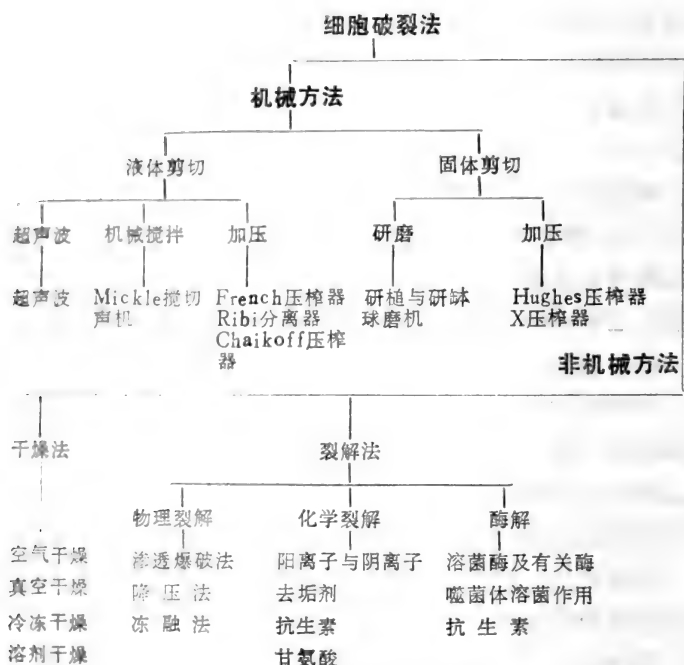


图25 细胞破裂法系谱图

处理可提供一种经济的细胞破裂方法，它便于在大规模下使用以获得许多产品（如酶）。化学处理带来的主要问题是成本问题、可能存在的毒性问题，以及化学物质的回收问题。

许多微生物酶可用于破裂微生物和植物细胞的外壁，因此有利于打破细胞膜。但是，消化酶相当昂贵，并且无法在工业规模中加以回收。

5.3 固相与液相的分离

在大多数过程中产物或处于固相或处于液相，首先要使

固相与液相分开，而后才能进行有效的分离。发酵液的固、液相分离是一项重要的单元操作，它包括沉淀、过滤、离心、浮选或动电分离等方式。图26列出了各种可用于颗粒回收的单元操作。这些方法取决于回收材料的分子或颗粒大小，并说明了与选择的每种方法有关的物化特性。

影响分离的主要因子

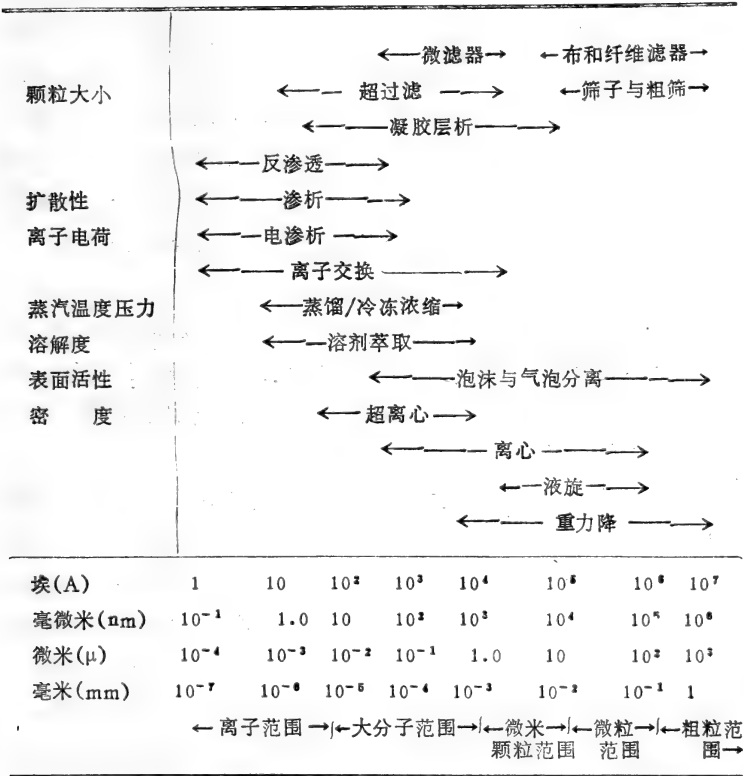


图26 各种单元操作的应用范围

在深入考察从固体或液体中提纯产物的方法之前，应该

简单介绍一下直接从未处理的发酵液中回收产品的几种方法。例如，链霉素和乙醇这两种重要产物，就是直接从发酵液中提取的。用分批发酵法生产的链霉素，可用离子交换树脂直接吸附的方法从生产的发酵液中取出，而用连续发酵法生产的乙醇，可用真空蒸馏法分离。真空蒸馏法提取乙醇可以不影响生产酵母的生活力，并且允许连续操作的进行。

5.3.1 过滤 过滤作为分离过程的起始步骤在实践中被广泛采用，而且特别适用于微生物的细胞。压滤机法是使用最广的过滤方法。压滤机的基本结构包括一系列可让反应器浆液通过的滤室。每个滤室的表面均覆盖有过滤介质。过滤介质可使固体颗粒保留在压滤机内，滤液则可通过滤布流入收集器供下一步处理。固体在滤板上积累增多时，可增加泵压补偿滤速的损失。有几种可利用的压滤机，其过滤面积可达 1000米^2 。

压滤法的一个主要障碍是生物固体的可压缩性。增加压缩会导致滤饼结构崩溃并引起物料通过量下降。助滤剂还可能被用于桥接过滤介质上的较大孔眼，持留细小颗粒和作为固体沉积的表面。

真空旋转过滤被广泛用于啤酒中酵母的分离以及许多废物处理过程。真空旋转过滤使用的设备型式各异，但都由一个圆筒形的转鼓组成。转鼓下部通过一个装满要过滤的生物悬液的槽而旋转。转鼓的筒形外壳由许多用过滤介质覆盖的浅室组成。转鼓通过液槽旋转时，对下部的浅室施以真空，滤液通过这些浅室后通过泵的作用排出。“绳索与刮刀——滤饼清除法”可清除累积的固体，并能使滤饼被连续稳定地清除。

5.3.2 漂浮、沉降与离心分离 漂浮分离是酒精饮料

工业和废水处理工艺中传统使用的方法之一。这种方法主要依靠细胞上升到液面而被收集的能力。漂浮法利用细胞浮力形成富含固体的泡沫，从而使固体与澄清的液体分开。

离心与沉降过程都有赖于颗粒的大小和刚性程度。沉降法也是某些工业（如废水处理和酒精饮料工业）中传统使用的方法之一。在沉降法中，颗粒或细胞通过简单的重力过程下沉到收集罐的底部。离心分离原理已得到广泛的发展，这些原理已在实验室水平用于生物固体的分离，但用于工业规模的操作仍有困难，并且成本较高。有效的离心操作要求颗粒与液体间存在较大的密度差异，并且要求液体粘度低，这些特性是一般的生物系统所不具备的。实际上，工业上的离心操作采用高角速度低容量的离心机进行。工业上已研制出一系列可用于分离微生物细胞、细胞碎片和沉淀物的离心机（如管筒式、多室式、碟片式和挂篮式离心机）。立轴操作的离心分离可产生奶油或流泥状的固体，而使用卧筒机进行离心分离可产生污泥状的固体。

5.3.3 空心纤维 涉及空心纤维的新概念为从发酵液中分离细菌、病毒和类似有机物提供了简便、迅速和经济的手段。这一独特的方法可获得快速纯化的效果，而且没有热和气溶胶形成，不会导致变性或其它常见的问题。空心纤维的特殊膜结构可有效地处理物料并且孔眼不会阻塞。这种膜（聚砜或丙烯酸共聚物）是各向异性的，其表面孔径最小，其下是高度可透性的亚结构。由于膜的表面特性，细菌和病毒以及比筛孔大的溶质都无法透过。由于所有滞留过程发生在膜的表面，过滤基质不会堵塞，因此可以保持高流速。这些膜装置使用错流系统或切向流系统，料液在膜上循环流动，连续地清除沉积物。

空心纤维丝容易用化学物质清洗,且能反复多次利用.处理大容量的物料时,可将空心纤维丝集结成束以满足各种生产量的需要。常规使用的容量均在10 000升以上。目前,这些系统在生物工艺过程中正在越来越多地被采用。

5.3.4 动电法 这些分离方法可产生固体含量很高的饼状物或沉积物,并且包括在电极处收集固体。该法使用的电压($10-50\text{Vcm}^{-1}$)可在电导液中引起电解而造成能量的浪费。

发酵液经不同方法完成初级处理和分离后,所需产物将主要分布在固体或液体中。这时的产物有的已经可以作为产品出售。然而,在通常情况下,初级分离后的产物还需要进行有限的、甚至广泛的进一步纯化才能达到公认的产品标准。

5.4 固相内产物

发酵液的初级分离可产生以下形态的固体之一:奶油状(固体含量约15% w/v)、脱水污泥状(固体含量20—25% w/v)或湿固体状(固体含量40% w/v以上)。湿固体可以用来直接销售,但一般为了保证产品的稳定性,湿固体还要进一步干燥。

固体的脱水程度要根据终产品的使用情况决定。大多数产品通常需要贮藏一段时间,为了防止变质,含水量应降低到5%左右。干燥技术的选择涉及时间与温度的关系:干燥时间长的,可以使用较低的温度;而干燥时间短的,则要求使用较高的温度。实际上,短时间干燥法使用较为普遍,其中包括表面膜干燥器(鼓式或带式)、喷雾和瞬间干燥器法。喷雾和瞬间干燥器必须在输入干燥空气的高温降条件下行使

功能，有时使用30℃以上的入口气温。发酵固体干燥时，任何停顿都将增加微生物污染和产物分解事件的发生。

生物量可以从湿污泥阶段提取，也可以从干燥的形式中提取。当使用溶剂萃取法时，为了从生物量中除去残留的痕量溶剂，使它可用来作动物饲料，需要进行汽提。能量成本因子对所有干燥过程具有重要影响。

单细胞蛋白需要在减少活生物体数的条件下干燥。例如，用于面包工业的酵母可以用两种形式获得，一种是压缩饼形式，另一种是活性干燥形式。压缩饼形式只能贮藏较短时间，因此需要较快使用（几天内）；而干燥形式则几乎具有无限的稳定性，产品可以贮藏或舶运海外而不发生大的活性损失。

5.5 从澄清液相中分离产物

已发现在发酵液分离的这个阶段，占很大比例的生物工程产品被包含在液相中。这类产品包括酶、有机酸、氨基酸、多糖和许多其它具有不稳定结构的蛋白质类分子。分离技术包括目前使用的普通加工工艺到专门为分子生物学发展起来的技术。目前，一系列实验室技术被发展用于液相系统的产物分离，这些技术中很多可在工业上用于大规模操作。分子的大小与构型将决定哪种方法可资利用（图26）。与化学方法相比，物理方法（特别是非热力学的物理方法）对生物学过程更有利，使用也较多。最后，方法的选择取决于产品质量、时间、经济性和适当设备的可用性。

从大多数生物工程过程的性质来看，液相是稀释的产物来源，倘若不及时处理很容易变质。迅速加工成较稳定的浓缩物是最重要的。

用来获得稳定终产物的方法在很大程度上取决于产物的化学性质。稳定的有机化合物（如柠檬酸、葡萄糖酸、衣康酸和草酸）适合采用常规的化学方法提取和精制；挥发性物质（如乙醇、丙酮、丁醇）宜采用蒸馏法，而不太稳定的化合物宜采用在常温或低温下操作扩散、吸附和许多其它一些物理过程的方法。目前广泛使用的多数工业过程可以认为是小规模操作，随着操作规模（第一章）的扩大，势必要发展新型的技术。

终产品的纯度水平因产品类型和公认的纯度标准而异。例如，有机酸、氨基酸和维生素等化合物主要以高纯度产品出售，而大多数酶、疫苗和类固醇则很少分离成纯的产品。工业上使用的多数酶（如淀粉酶、蛋白质酶、果胶酶）浓度通常为1—5%。有关产物分离技术的实例见图27和28。

产物最后回收的成本各不相同，SCP和乙醇的回收成本较低，而疫苗、单克隆抗体和其它药用产品的回收则需要昂贵的技术。

除了干燥、蒸发和蒸馏需要提高温度外，其它所有出料加工过程都是在室温或更低的温度下进行的。

下面简要介绍一下用于从液态中提取产物的主要单元操作所涉及的原理。

5.5.1 沉淀 沉淀作为产物分离与纯化的手段被广泛用于工业规模的操作，而且可用无机盐、有机溶剂或高分子量的多聚物进行。通过差速沉淀，产物可保留在溶液中或聚集为沉淀物，从而可排除许多杂质，特别是蛋白质。从液态的溶液中提取柠檬酸时，可以使柠檬酸首先生成柠檬酸钙沉淀，然后用硫酸溶解柠檬酸钙获得 CaSO_4 ，除去钙。这样获得的相当纯的柠檬酸溶液然后可进行蒸发和结晶处理（图27）。

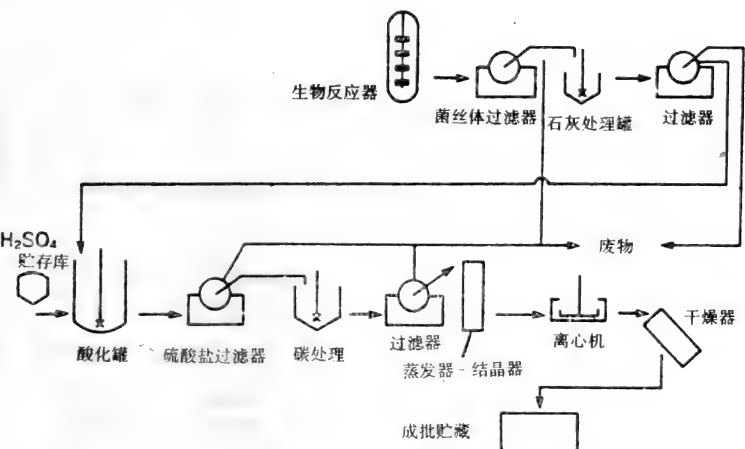


图27 柠檬酸制造流程图

硫酸铵或硫酸钙等中性盐长期被用于从液态的混合物中盐析分离蛋白质的过程。硫酸铵成本低、溶解度高、无毒性，并具有使许多酶稳定化的趋势。

有机溶剂被广泛用于产物的分离，特别是蛋白质的分离。一般认为，有机溶剂可降低介质的介电常数，允许带相反电荷的蛋白质分子成为复合分子而沉淀。特别是，甲醇、乙醇和异丙醇已在工业上使用，但由于这些溶剂比较贵重，因而回收成本较高。离心机的气溶胶遏制与激发试验是必要的投入。有机溶剂还被广泛用于某些抗生素的回收。

葡聚糖和聚乙烯乙二醇等高分子量多聚物有时也被用于

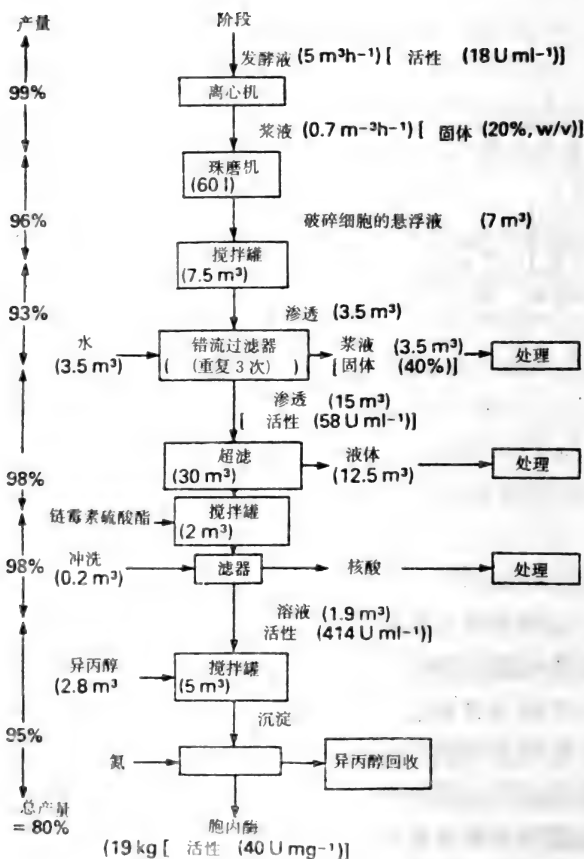


图28 胞内酶生产流程示意图(按每12小时 50 m^3 发酵液计算, 其中包括操作时间10小时、清洗时间2小时) 活力数据适合于酰胺酶

使蛋白质沉淀的过程。这些技术在实验室规模上成本较低，但在工业规模上由于从产物中除去外来的沉淀多聚物较困难，因而成本较高。

5.5.2 薄膜过滤 薄膜过滤是一种无蒸发地浓缩溶质和除去水的工艺操作。为了使水通过半透膜，施用的压力必须大于膜两边的渗透压力差。薄膜分离技术主要在常温下进行（蒸发与冷冻干燥技术却不同），因此可避免产物的破坏，如蛋白质的降解。

反渗透和超滤都是压力驱动的薄膜过滤过程，其部分溶质的分子量范围低于500—1000，薄膜对这些物质具有阻截作用。起初，这些半透膜（由醋酸纤维或聚酰胺制成）被用于海水和咸淡水的脱盐。如今这些膜的新一代得到了发展：这种新一代的膜叫薄膜复合膜。这种膜由更耐腐蚀的材料制成，并且能够在高温和宽的pH值条件下操作。这种膜通常很薄，具有孔径严格的多孔结构，并且被结合在一种厚为125—250 μm 的粗糙材料上，因此可提高机械强度，抵抗高的液压力。原则上，这些膜应该允许高的透过率，并有十分明确的分子量阻截点。

这种膜的主要问题是，寿命受污损影响很大。清洗不当可导致透过率下降，形成与其它产物的交叉污染，还可能引起微生物污染。因此必须经常细心地加以维护。尽管如此，这些新的特殊薄膜在发酵液的液相浓缩过程中将获得更广泛的应用，这一点是非常乐观的。

5.5.3 层析 层析指可通过含有精细分级物质的层析柱，选择性地限制溶质通过率的一系列技术。层析法一般只在发酵产物提纯的后期使用。典型的层析法可以包括四种独立的层析技术。

5.5.3.1 吸附层析 在这类层析中,许多无机化合物(包括氧化铝、活性炭、羟磷灰石和硅藻土)利用范德华氏引力和空间互作吸附蛋白质和其它低极性含量的物质。这些低成本的技术被广泛用于许多的生物工程过程,如链霉素和头孢霉素的生产过程。

5.5.3.2 亲和层析 亲和层析是一种特别有效的吸附层析类型。在亲和层析中,柱的基体含有一种分子或配基,它对要分离的物质具有高度特异性的束缚性亲和力。这种结合是特异性的并且是可逆的。通过改变条件使之不再有利于结合,即可实现洗脱。亲和层析基体的这种高度特异性和能力意味着好的流速和快速的分离与纯化,因为柱床体积一般是小的。

在某些类型的亲和层析中,特异性的化合物通过共价键与珠状琼脂糖凝胶偶联。例如,葡聚糖硫酸酯琼脂糖可用于分离各种对葡聚糖硫酸酯表现特异性和可逆性亲和的大分子;这类产物包括肝炎B表面抗原、 β -脂蛋白和血纤维蛋白质。大规模亲和层析在生物工程中是一个重要性正在增加的领域,在人干扰素的纯化方面正在得到应用,并且正在用于从医用物质中排除痕量的污染物,如热原、病毒、蛋白水解酶等。大规模亲和层析还可用于酶的纯化(表32)。

5.5.3.3 离子交换层析 这种方法的分离取决于蛋白质的净电荷、电荷密度和分子大小以及溶液的pH值和离子强度。树脂和纤维素是两种最常用的离子交换物质。这些不溶于水的多聚物可以以阳离子交换剂或阴离子交换剂形式出现。树脂物理性质稳定,填充到层析柱中时沉降块,并且具有高的流速和高的蛋白质吸附能力。通过控制离子强度或pH值(或同时控制离子强度和pH值)可进行洗脱。

5.5.3.4 凝胶过滤层析 近年来这种层析方法已经十分

表 32 以染料为配基的大规模亲和层析示例

蛋 白 质	吸 附 剂	柱体积(升)	洗 脱
磷酸甘油酸激酶(酵母)	以蓝色染料Cibacron Blue 3G-A为配基的琼脂糖凝胶Sepharse 4B	0.5	NaCl梯度
乙醇脱氢酶(马肝)	取代基琼脂糖凝胶Blue Sepharose CL-6B	1.5	10mM NAD ⁺
3-羟基丁酸酯 [*] (<i>Rhodospseudomonas</i> <i>Sphaeroides</i>)	以红色染料Procion Red H-3B为配基的琼脂糖与以蓝色染料Procion Blue MX-4GD为配基的琼脂糖结合	1.5	1M KCl
苹果酸脱氢酶 (<i>R.sphaeroides</i>)	以红色染料Procion Red H-3B为配基的琼脂糖与以蓝色染料Procion Blue MX-4gd为配基的琼脂糖结合	1.0	2mM NADH/ KCl梯度
甘油激酶(<i>B.stear- othermophilus</i>)	以蓝色染料Procion Blue 3G-A 为配基的琼脂糖凝胶Sepharse CL-4B	3.5	5mM ATP
人血清白蛋白(Cohn Fraction IV)	以蓝色染料Cibacron Blue 3G-A为配基的琼脂糖凝胶Sepharse CL-6B	16	3M NaCl

• 原文为3-Hydroxybutyrate, 系 β -Hydroxybutyrate dehydrogenase(β -羟基丁酸脱氢酶)之误。——译者注

普及，它取决于利用交联葡聚糖、琼脂糖、多孔玻璃或聚丙烯酰胺等物质产生孔径大小精确控制的层析胶的能力。凝胶过滤层析与离子交换或吸附层析有着根本的不同。在凝胶过滤层析中，分子组分不被束缚，并且可通过改变元素的性质而选择性地洗脱；分子的分离是由于分子在通过孔眼时受到的阻滞作用不同而实现的。从原理上讲，凝胶过滤是溶质分子在易流动的溶剂相与组成固定相的多孔凝胶内部空间所保持的溶剂相之间进行的扩散分配过程。扩散交换发生在固定相与流动相之间。凝胶过滤过去主要用于小的实验室规模操作，但这些原理在大规模产物精制过程中的应用进展很快。层析生产工艺的设计（如凝胶基质、洗脱条件和床高等）可以首先在实验室优化。层析过程由实验室水平加以放大，可通过增加床宽但不增加凝胶床高度的方式获得。这样，以前制订和优化的所有参数均可原封不动地移植到大规模系统。在商业规模上，利用交联葡聚糖凝胶Sephadex G-5，可在猪胰岛素或牛胰岛素的后期精制过程中除去胰岛素原和其它高分子杂质。

5.6 产品的稳定性

大多数由生物工程过程生产的终产物具有一定程度的不稳定性，因此必须加工成适合稳定贮存的形式。干燥是迄今提高产品稳定性使用最广的方法。干燥技术的具体选择，应根据技术的成本和达到最高产品稳定性水平的可能性决定。

喷雾干燥已被广泛地采用，它依靠料液以雾滴形式分散于热气流中。水分被蒸发，留下随后可以收集和包装的干燥的固体颗粒。流化床可以在较低温度时使用，而各种膜式蒸

发器（包括温度低于30℃）可以广泛使用（特别是用于酶）冷冻干燥一般用于稳定性很差的产品，但投资和操作成本较高。

有的产品以干燥形式出售，它们包括有机酸、氨基酸、抗生素、多糖、酶、SCP等等。有的产品不便于干燥，或者所需产品为液态形式。此时，产品贮存的稳定性主要受两大因素影响：微生物对溶液中产物的分解和蛋白质的变性。

限制液态产品中微生物生长的方法包括利用化学防腐剂、低热灭菌、加盐和多羟基醇、辐射以及利用高度浓缩的盐溶液和糖溶液等。低温贮存虽然也可抑制微生物生长，但一般无法在公认的有效保存期内使产品保持恒定的低温。

液态溶液内产物（特别是蛋白质）的变性问题是是个有待克服的难题。溶液中的某些酶在存在某些离子（如 Ca^{++} ）时稳定性可大为改善。其它防护性措施包括加入氧气结合与螯合剂、利用缓冲液、掺入底物、排除污染性蛋白溶解酶等。

虽然产品产量的许多改进将继续有待于整个生物工艺过程的“积极的”一面——生物的选择与改良以及生产技术的改进，但对于大多数产品来说，通过大力加强产物分离与精制过程，仍能增加产物形成的经济性。

5.7 利用重组DNA技术的前景

商业性的生物工艺过程能否取得成功和有利可图与许多因素有关，其中包括所选生物的特性、培养基的成本、需要的设备、发酵与操作成本以及分离与精制过程的成本等。显然，经济分析必须着眼于如何使生产成本与市场的现实价格相适应。因此，对生物进行遗传操作提高发酵速率，可减少

投资与操作成本提高经济效益。

许多新的生物工程产品将是蛋白质和酶。目前遗传工程与发酵工程的发展正在对出料加工过程产生重要的影响。例如,许多重要的工业酶(淀粉酶、蛋白酶等)可由生产菌活跃地分泌到体外,因此为出料加工过程提供了很大的方便。通过遗传操作使其它原来存在于胞内的蛋白质(如干扰素)分泌到体外是非常可能的,这样将简化产品的精制过程。同样,通过控制遗传活动选择性地降解污染性蛋白质与核酸也是可能的。最后甚至可能将形成产物的基因转移到其它便于产物出料加工的更合适的生物中。

本章提要

出料加工即生物工艺过程的产品精制,代表了大多数工艺总成本中的主要部分。出料加工过程的改造,可提高整个工艺过程的总效率和降低总成本。出料加工过程主要包括首先使发酵罐中的发酵液初步分成固相和液相两部分,然后进行产物的浓缩与精制。加工过程一般分多步进行。

发酵液不稳定,容易受微生物污染而且产物易分解。出料加工过程的起始步骤一般包括大幅度浓缩产物、减少液相体积、降温只适合小容量过程,对于大容量过程是不经济的。加工方法的选择主要取决于产品的理化性质。

对反应器的发酵液首先进行预处理即调制处理,其目的是为了改善相继的发酵液处理特性。采用的方法包括利用细胞和固体的絮凝反应、凝胶的凝结反应,并且在必要时打破细胞释放胞内产物。可用于实验室和大规模操作的细胞破裂技术很多,其中包括机械法、化学裂解法和酶裂解法等。

从液相发酵液中分离固相的方法有沉淀、过滤、离心、漂浮和电动分离等。方法的选择决取于分子或颗粒的理化性

质。对固体部分作进一步出料加工的程度取决于产品的最终用途。如果不需要固体，则可按一般的污水处理方法处理。

澄清液相的产物分离可利用定型的**化学加工**技术和那些专门为生物分子建立的其它技术进行。分子的大小与构形可决定使用的提取方法。此外，方法的选择还受产品质量、时间与总的经济效益影响。产品的最后纯度因产品类型和所需纯度标准而异。目前使用的方法包括蒸发、蒸馏、沉淀、膜过滤、吸附、亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析。

终产品的稳定性，特别是贮存期间的稳定性可通过喷雾干燥、流化床干燥或冷冻干燥法获得。液体溶液中的产品必须防止微生物污染和蛋白质类产物的变性。

附录一 名词解释

Aerobe (需氧生物): 需要分子氧的生物。

Anaerobe (厌氧微生物): 在没有分子氧的条件下生长的微生物。

Anaerobic digestion (厌氧消化): 主要指在几乎没有空气的条件下发生的, 由有机物转化为甲烷和 CO_2 的细菌发酵过程。

Antigen (抗原): 指注入脊椎动物体内后可刺激产生中和蛋白质的分子。

Bioreactor (生物反应器): 发酵过程的容器系统。

Budding (芽殖): 酵母中常见的一种无性繁殖方式。

Callus (愈伤组织): 能够重复细胞分裂的植物细胞群。

Catabolite repression (降解物阻遏): 许多微生物的操纵子在葡萄糖存在时活力下降。

Chromosome (染色体): 细胞核内载有基因的线状结构。

Cloning (克隆化): 从相似成分的混合物中分离能繁殖的单个成分并进行分别繁殖的过程。

Cohesive ends (粘性末端): 具有互补性单链末端并可引入的片断首尾连接的DNA分子。

Conditioning (调制): 指为改善发酵液的处理性能进行的前处理。

Conjugation (接合): 指细菌通过细胞与细胞的接触将遗传物质由一个细胞转移到另一个细胞的过程。

Culture (培养物): 细胞群体。

Diploid (二倍体): 具有成对染色体的细胞。

Downstream processing (出料加工): 指发酵过程中产物的

分离与精制过程。

Enzyme (酶)：由细胞产生并保持在细胞内(胞内酶)或分泌到细胞外(胞外酶)起催化剂作用的蛋白质。

Growth curve(生长曲线)：用于描述分批培养过程中，生物在培养基中生长情况的图示。

Haploid (单倍体)：具有单一染色体组的细胞。

Hypha (菌丝)：构成真菌的基本单位；真菌的丝。

Immobilisation (固定化)：指酶或细胞由游离的可移动状态转变为固定状态的过程。

Induction (诱导)：在小分子(诱导物)存在时酶的合成速度增加的现象。

Koji (日本酒曲)：在特定的固体或半固体培养基(通常为谷物或麦麸)上生长的线状霉菌，主要为曲霉(*Aspergillus*)。

Linker (连接物)：指具有限制性酶的位点可用于基因拼接的小片断人工合成DNA。

Mass transfer (质量转移)：指在生物体表面与外部环境间进行的物质交换过程。

Medium (培养基)：营养物质的混合物。

Meiosis (减数分裂)：指一个二倍体细胞分裂产生两个单倍体细胞的细胞分裂过程。

Metabolite (代谢物)：生化活动的产物。

Mutation (突变)：指基因发生的，可通过繁殖过程遗传的稳定变化。

Mycelium (菌丝体)：集体名词，表示由菌丝构成的网状组织。

Mycotoxin (真菌毒素)：指真菌产生的可引起人或动物毒性反应的低分子量次级代谢物。

Parasexual processes (准性过程)：包括营养细胞中发生的所有不经过减数分裂的基因重组过程。

Plasmid (质粒)：染与色体不连锁的可稳定遗传的DNA分子。

Protoplast (原生质体)：指除去细胞壁后的微生物或植物细胞，形状为球形。

Pure culture (纯培养物)：只含有一种生物的培养物。

Restriction endonuclease (限制性内切酶)：通过内核苷酸水解切割作用，对未经特殊甲基化的外源DNA起破坏作用的酶。

Screening (筛选)：从大群体中分离特定生物或代谢物的选择性过程。

Sexual hybridization (有性杂交)：指通过相对交配型的单倍体核融合，进行遗传物质重组的过程。

Solid substrate fermentation (固体底物发酵)：指微生物在没有或几乎没有游离水的固体物质上生长的过程。

Somatic hybrid (体细胞杂种)：不经过有性过程产生的无性杂种。

Splicing (拼接)：即基因拼接，指将一种DNA分子连接到另一种DNA分子上所进行的操作。

Termination sequence (终止序列)：在转录单位的末端，起指示终止转录作用的DNA序列。

Transduction (转导)：指遗传物质以病毒为载体，从一个细胞转移到另一个细胞，并通过重组相结合的过程。

Transformation (转化)：指DNA被细菌单向吸收并稳定保持的过程。

Transposon (转位子)：指可以独立于宿主细胞重组系统，随机插入质粒或细菌染色体的DNA成分。

附录二 名词索引

(以中文汉语拼音为序)

- A**
氨苄青霉素 Ampicillin..... (93)
- B**
半乳糖苷酶 Galactosidase..... (45)
包埋 Entrapment (117)
保加利亚乳杆菌 Lactobacillus bulgaricus..... (97)
丙酮 Acetone (4,54)
- C**
草菇 Volvariella volvacea..... (21,96)
产量常数 Yield constant (59)
产率 Output rate..... (81)
重组 Recombination (16)
沉淀 Precipitation (148)
沉降 Settling..... (144)
赤霉素 Gibberellins..... (54)
初级代谢物 Primary metabolites..... (54)
出料加工 Downstream Processing... (8,134)
醋酸 Acetic acid..... (4,54)
次级代谢物 Secondary metabolites..... (54,94)
- D**
大肠杆菌 Escherichia coli..... (25,34,44)
单倍体 Haploid (23)
单克隆抗体 Monoclonal antibody ... (6,13,32)

单细胞蛋白	Single cell protein..... (24)
蛋白酶	Protease (54, 106, 107)
氮芥	Nitrogen mustard (20)
担子菌类	Basidiomycetes (21)
底物	Substrates (8, 11)
淀粉酶	Amylase (54, 107)
丁醇	Butanol (4)
堆肥	Composting (97)
E	
二倍体	Diploid (22)
F	
发酵	Fermentation (39)
~产品	products (53, 36)
~工艺变量	process variables (57)
~培养基	media (71)
放线菌素	Actinomycin (54)
非牛顿型发酵液	Non-Newtonian broth..... (81)
分解代谢抑制	Catabolite repression (73)
分批培养	Batch culture (59)
分选	Sorting (6)
G	
干扰素	Interferons (2, 6, 47, 85)
杆菌	Bacillus (25, 35, 47)
枯草杆菌	B. subtilis (25, 35, 47)
嗜热脂肪芽孢杆菌	B. stearothermophilus ... (112)
巨大芽孢杆菌	B. megaterium (112)
凝结芽孢杆菌	B. coagulans (122, 123)
根霉	Rhizopus sp. (96)
工艺放大	Scale up process (83)

共价偶联	Covalent coupling..... (117)
固定化技术	Immobilization techniques (7,117)
固定化酶	Immobilized enzymes..... (116)
固定化葡萄糖异构酶	Immobilized glucose isomerase(121)
固定化酶的局限性	Limitation (121)
果胶酶	Pectinase (54)
固体底物发酵	Solid substrate fermentation... (55)
~例子	examples..... (95)
~生物反应器系统	bioreactor systems... (101)
过程控制	Process control (8)
过滤	Filtration..... (144)
H	
合成代谢反应	Anabolic reaction..... (1)
核配	Karyogamy (21)
互补	Complementation (45)
化学诱变剂	Chemical mutagens (20)
环流式发酵	Loop fermentation (67)
黄原	Xanthans (54)
活性污泥工艺	Activated sludge process (71)
J	
基因	Gene (6)
基因工程	Genetic engineering (6,15,34)
基因型	Genotype (17,21)
基因组	Genome (6,16)
机械剪切	Mechanical shearing (41)
激素	Hormones..... (13,47,85)
加倍时间	Doubling time..... (58)
加速期	Acceleration phase (61)
甲基酶	Methylase (39)

甲基磺酸乙酯	Methylmethene sulphonate ... (20)
甲烷发酵	Methane fermentation..... (71)
减数分裂	Meiosis (21)
交换	Crossing over..... (25)
搅拌	Agitation (66)
酵母	Yeast (44)
酵母菌	Saccharomyces sp. (22)
啤酒酵母	S. cerevisiae (109)
节杆菌属	Anthrobacter (123)
接合	Conjugation..... (16,23)
接头	Linkers (42)
解纤维素毛壳酶	Chaetomium cellulolyticum ... (98)
解脂假丝酵母	Candida Lipolytica (98)
菌株退化	Strain degeneration..... (18)
K	
抗生素	Antibiotics (5,7,9,16,136)
克隆化	Cloning (32,34,36)
口服毒性	Oral toxicity (116)
L	
冷冻保藏	Cryopreservation (18)
冷冻干燥	Freeze drying (18)
离心	Centrifugation (144)
离子辐射	Ionizing radiation..... (20)
里斯木霉	Trichoderma reesei (112)
连接	Ligation (38)
连续培养	Continuous culture (61)
链霉菌属	Streptomyces sp. (19,122,123)
暗色产色链霉菌	S. phaeochromogens..... (123)
白色链霉菌	S. albus..... (19)

橄榄色链霉菌	<i>S. olivaceus</i> (123)
金霉素链霉菌	<i>S. aureofaciens</i> (123)
链霉素	Streptomycin (54)
硫杆菌	Thiobacillus sp. (96)
流化床反应器	Fluidized bed reactor (130)
硫酸脂酶	Sulphatase..... (37)
M	
毛霉属	<i>Mucor</i> (109)
灭菌	Sterilization (4,64)
分批灭菌	Batch sterilization (95)
连续灭菌	Continuous sterilization... (65)
酶	Enzymes..... (105)
胞内酶	intracellular (108)
胞外酶	extracellular (108)
核酸内切酶	endonuclease (39,51)
DNA连接酶	DNA ligases..... (37,43,54)
米苏里游动放线菌	<i>Actinoplanes missouriensis</i> ... (122)
尿氧化酶	Uric oxidase (54)
类固醇	Steroids..... (5,53)
柠檬酸	Citric acid (150)
内含子	Introns (41)
P	
漂浮	Flotation..... (144)
拼接	Splicing..... (41)
葡萄糖异构酶	Glucose isomerase..... (7,109)
普鲁丁工艺	Pruteen process (24)
Q	
汽油酒精	Gasohol (11)

纤维二糖酶	Cellobiase..... (99)
纤维素酶	Cellulase (99,109)
青贮	Ensiling (97)
青霉属	Penicillium sp. (19)
产黄青霉	<i>P. chrysogenum</i> (19)
娄地干酪青霉	<i>P. roqueforti</i> (96)
青霉素	Penicillin (54)
曲霉属	<i>Aspergillus</i> sp. (19)
黑曲霉	<i>A. niger</i> (96,109)
米曲霉	<i>A. oryzae</i> (96,109)
去氧核糖核酸	DNA (6)
DNA杂种	DNA hybrid..... (6)
DNA连接酶	DNA ligase (37,43)
DNA重组体	DNA recombinant... (6,14,38)
R	
染色体	Chromosome (22)
热传递	Heat transfer (100)
热函	Enthalpy (81)
日本酒曲工艺	Koji process (98)
溶解氧	Dissolved oxygen..... (76)
溶菌消化作用	Lytic digestion..... (37)
S	
伞菇	<i>Agaricus</i> (3)
二孢蘑菇	<i>A. bisporus</i> (21)
筛选	Screening (15)
声处理	Sonication (41)
生物反应器	Bioreactor..... (8,55)
~设计标准	design criteria (64)
~类型	type (67,100)

生物解毒作用	Biodetoxification	(7)
生物量	Biomass	(9,58)
生长期	Trophophase.....	(111)
生长曲线	Growth curve.....	(60)
衰亡期	Death phase.....	(61)
水分活性	Water activity	(97)
水解酶	Hydrolases	(106,132)
丝裂霉素C	Mitomycin C	(20)
四环素	Tetracycline.....	(19,39)
双孢拟内孢霉	Endomycopic bispora	(112)
T		
塔式反应器	Tower reactor.....	(67)
体细胞杂种	Somatic hybrid	(30)
天冬酰胺酶	Asparaginase	(54,109)
停留时间	Residence time	(62)
头孢霉	Cephalosporium.....	(19)
顶头孢霉	C. acremonium	(17)
头孢菌素	Cephalosporin.....	(54)
土霉素	Oxytetracycline.....	(54)
突变	mutatio n	(6,23)
W		
维生素	Vitamins	(54)
喂料分批培养	Fed-batch culture.....	(55,63)
稳定期	Stationary phase	(28,60)
蜗牛酶	Helicase.....	(27)
X		
吸附	Absorption.....	(120)
细胞	Cell.....	(85)
~固定化	immobilisation.....	(7)

~培养	culture	(89)
~破裂	disruption	(141, 142)
~融合	fusion	(31)
香菇	<i>Lentinus edodes</i>	(21, 96)
限制性内切酶	Restriction endonuclease	(39)
硝化呋喃	Nitrofurans	(20)
胸腺嘧啶饥饿	Thymine starvation	(20)
5-溴尿嘧啶	5-Bromouracil	(20)
选择	Selection	(16)
Y		
氧气传递系数	Oxygen transfer coefficient	(69)
胰岛素	Insulin	(6, 47)
乙醇	Ethanol	(4)
异核体	Heterokaryon	(25)
转位	Translocation	(28)
延滞期	Lag Phase	(60)
厌氧消化器	Anaerobic digester	(67)
F-因子	F-factor	(24)
有丝分裂重组	Mitotic recombination	(25)
有性的	Sexual	(21)
有性杂交	hybridization	(21)
有性重组	recombination	(6)
诱变剂	Mutagens	(20)
诱变育种	Mutagenesis	(19)
疫苗	Vaccine	(5)
原核生物	Prokaryote	(21)
原生质体融合	Protoplast fusion	(6)
Z		
杂交育种	Hybridization	(15, 21, 46, 51)

载体分子	Carrier molecule (6)
真核生物	Eukaroyote (21)
真菌毒素	Mycotxin (115)
质粒	Plasmid (23, 44)
~嵌合体	~chimera (42)
质量传递	Mass transfer (78)
致瘤农杆菌	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (44)
自然选择	Natural selection (18)
指数生长期	Exponential phase (28, 58)
终产物抑制	End product inhibition (112)
转导	Transduction (16, 24)
转化	Transformation (16, 24, 47)
转化酶	Invertase (54, 109)
准性过程	Parasexual process (25)
~机制	~mechanism (25)
子囊菌类	Ascomycetes (21)
自交	Aelf-fertilization (21)
组织培养	Tissue culture (6)

参考文献: 第1章:

- Anon.(1982)Biotechnology market predicted to grow to S64 Bby 2000. *European Chemical News* 15 March.
- Anon. (1984) .*The FAST Report. Eurofutures—the challenges of innovation*. Butterworths, London.
- Anon. (1984). *Splicing Life: The Social and Ethical Issues of Genetic Engineering with Human Beings*.
- President's commission for the Study of Ethical Problems in Medicine and Biomedical & Behavioural Research. Washington DC.

- Atkinson, B. and Sainter, P.(1982). Downstream biological process engineering. *The Chemical Engineer* November; 410-9.
- Bull, A. T. , Holt, G. and Lilly, M. D. (1982). *Biotechnology-International Trends and Perspectives* . OECD Publications Office. 75775 Paris, Cedex 16 France.
- Demain, A.L. (1983).New applications of microbial products.*Science* 219, 709-14.
- Dunnill, P. (1981), Biotechnology and industry. *Chemistry and Industry* April; 204.
- Dunnill, P, and Rudd, M.(1984). *Biotechnology & British Industry*. A report to the Biotechnology Directorate,SERC, London.
- Kirk, T. K., Jeffries, T. W. and Leatham, G.F. (1983). Biotechnology; applications and implications for the pulp and paper industry. *Tappi.Journal* 66,45-51.
- Lynch, J. (1984). *Soil Biotechnology*. Blackwell Scientific.
- Pramer, D. (1983). Ensuring quality education in biotechnology. *Biotechnology* April 211-2.
- Rehm, H-J.(1980). *Industrielle Mikrobiologie* 2nd edn Springer, Berlin and Heidelberg. New. York
- Rehm, H-J.and Reed, G.(1982). Biotechnology, Vol. I. *Microbial Fundamentals*. Verlag Chemie, Basel.
- Royal Society Report (1981). *Biotechnology and Education*. *Scientifi American*(1981). Special Edition, Industrial Microbiology.

Sherwood. M.(1984). The case of the money-hungry microbe. *Biotechnology* July, 606-9.

Smith.J. E.(1981) . *Biotechnology*. Studies in Biology No. 136, Edward Arnold, London.

第2章:

Anon (1984) *Genetic Engineering of Plants* National Academy Press, Washington.

Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing *Science* 204: 264-71.

Dietz, A.(1981) .Pure culture methods for industrial microorganisms. In; *Biotechnology*, Vol. I, *Microbial Fundamentals*, pp. 411-34 Edited by H. J.Rehm and G Reed. Verlag Chemie, Basel.

Esser, K and Stahl, U. (1981). Hybridization.In; *Biotechnology*, Vol, I, *Microbial Fundamentals*, pp. 305-29. Edited by H J. Rehm and G Reed. Verlag Chemie Basel

Evans, D.A. (1983). Agricultural applications of plant protoplast fusion *Biotechnology* May, 253-61.

Glover, D. M. (1980). *Genetic Engineering-Cloning DNA* Chapman and Hall, London.

Hardy K.(1981). *Bacterial Plasmids* Aspects of Microbiology, 4 Van Nostrand Reinhold (UK) Wokingham

KirsoP, B. (1983). Culture collections-their services to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1:4-8.

Kohler, G. and MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*(London)256, 495-7.

Kornberg, A (1980). *DNA Replication*, W.H. Freeman

San Francisco

Manniatis, T., Frittsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Murray, K. (1980). Genetic engineering: possibilities and prospects for its application in industrial microbiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, London 290: 369-89.

Nisbet, L.J. (1982). Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32: 251-70.

Old, R.W. and Primrose, S.B. (1981). *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*. Blackwell. London.

Peberdy, J.F. (1979) Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology* 33: 21-39.

Priest, F.G. (1984). *Extraellular Enzymes Aspects of Microbiology* 9. Van Nostrand Reinhold (UK), Wokingham.

Rowlands, R.T. (1983). Industrial fungal genetics and strain selection. In: *The Filamentous Eungi* Vol. 4, *Fungal Technology*, pp. 346-72. Edited by J.E. Smith D.R. Berry and B. Kristiansen Edward Arnold. London.

Schell, J. and Vanmontagu, M. (1983). The Ti-plasmids as natural and as practical gene vectors for plants. *Biotechnology* April, 175-80.

Secher, D. S. (1980) Monoclonal antibodies by cell fusion *Immunology to-day* July, 22-6.

- Selow I. K. and Hollaender, A. (Eds) (1980). *Genetic Engineering: Principles and Methods* Plenum Press, New York and London.
- Timmis, K. N. (1981). Gene manipulation *in vitro*. *Symposium Society of General Microbiology* 31:49-109.
- Watson, J. D. Tooze, J. and Kurtz, D. T. (1984) *Recombinant DNA: a short course*. A Scientific American Book Freeman, New York.
- Wilson, T. (1984) Engineering to-morrow's vaccines *Biotechnology* January, 29-39.
- Zimmermann U. (1983). Electrofusion of cells, principles and industrial potential. *Trends in Biotechnology* 1, 149-55

第3章:

- Arima, K. (1964). Microbial enzyme production. In: *Global Impacts of Applied Microbiology*. Edited by M.P. Shaw Wiley New York.
- Armiger, W.B. (Ed) (1979) *Computer Application in Fermentation Technology*, Biotechnology and Bioengineering Symposium 9. Wiley, New York
- Barrer, P.J. (1983). Crucial factors for design of a pilot. plant *Biotechnology* October, 661-6.
- Brown, D.E. (1982). Industrial scale operation of microbial processes *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 32, 34-46.
- Bull, A.T. Holt, G. and Lilly, M.D (1982) *Biotec-
hnology: International Trends and Perspectives* OCDE Report.
- Cannel, E and Moo-Young, M. (1980). Solid

- substrate fermentation systems *Process Biochemistry* June/July and August/September.
- Cooney, C. L. (1983). Bioreactors: design and operation. *Science* 219:728-33.
- Corbett, T. K.(1980). Preparation, sterilization and design of media In: *Fungal Biotechnology*, pp 25-41. Edited by J.E. Smith.D.R. Berry and B. Kristiansen Academic Press, London and New York.
- Curtin, M.E.(1983). Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnology* October; 649-57.
- Fiechter, A. (1981). Batch and continuous culture of microbial, plant and animal cells.In: *Biotechnolgy* Vol.1. pp.453-505. Verlag Chemie,Basel.
- Flannery.R.J. and Steinschneider , A. (1983) Fermentation economics in relation to genetic engineering *Biotechnology* November, 773-6.
- Flynn, D.S. (1983). Instrumentation and control of fermenters. In: *The Filamentous Fungi*, Vol.4 pp.77-100. Edited by J. E. Smith, D. R. Berry, and B. Kristiansen, Edward Arnold, London.
- Fowler, M.W. (1981) Plant cell technology *Chemistry and Industry*;229-33.
- Friedland, P. (1983) . The role of computers in biotechnology *Biotechnology* September, 565-75.
- Glacken, M.W. Fleischaker, R.J.and Sinskey A. J. (1983). Mammalian cell cultures: engineering principles and scale up *Trends in Biochemistry* 11,102-8.
- Hesseltine, C.W. (1977). Solid state fermentations.

Process Biochemistry July/August.

Kristiansen, B. and Chamberlain, H.E. (1983). Fermenter design In: *The Filamentous Fungi* Vol.4, pp.1-19. Edited by Smith, J.E. Berry, D.R. and Kristiansen, B. Edward Arnold, London.

Margaritis, A. and Blair Wallace, J (1984) .Novel bioreactor systems and their applications. *Biotechnology* May;447-53.

Mattiason, B, Mandenius, C. F., Axelsson, J. P. Danielsson, B. and Hagander, P. (1983) Computer control of fermentations with biosensors. *Annals New York Academy Sciences* 413, 193-6.

Moo-Young, M, Moreira, A. R. and Tengerdy R.P. (1983) . Principles of solid substrate fermentations In: *The Filamentous Fungi*, Vol.4. pp. 117-44. Edited by Smith, J. E, Berry, D. R. and Kristiansen, B. Edward Arnold London.

Norby E. (1983) .Viral vaccines; the use of currently available products and future developments. *Archives of Virology* 76, 163-77.

Pirt, S. J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Halsted Press, New York.

Rhodes, A. and Fletcher, D.L. (1966). *Principles of Industrial Microbiology*. Pergamon Press, Oxford.

Rhodes, M. J. C. and Kirsop, B. H. (1982) . Plant cell cultures as sources of valuable secondary Products *Biologist* 29, 134-40.

Riviere, J. (1977). *Industrial Applications of Microbiology* Translated M.O. Moss and J.E. Smith Surrey

University Press *Scientific American*(1981), *Industrial Microbiology* (Special edition).

Sinclair, C.G. and Mavituna, F. (1983). Mass and energy transfer. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 4, pp.20-76. Edited by J.E. Smith, D.R. Berry, and B. Kristiansen. Edward Arnold, London.

Sittig, W. (1982). The present state of fermentation reactors *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32, 47-58.

Spier, R.E. (1981). The use of animal cell culture in pharmaceutical production processes. In: *Topics in pharmaceutical Sciences*, pp. 511-33. Edited by D. D. Breiner and P. Speiser. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Spier, R.E. (1982) Animal cell technology; an overview *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 23, 304-12.

Tolbert, W. R. and Feder, J. (1983). Large-scale cell culture technology. *Annual Report Fermentation Proceedings* 6, 35-74.

van Wezel, A. L. (1982). Cultivation of anchorage-dependent cells and their applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32, 318-23.

Winkler, M. (1981). *Biological Treatment of Waste Water* Ellis Horwood, Chichester.

第4章:

Chibata, I. (1978). *Immobilized Enzymes, Research and Development*. Wiley, New York.

Chibata, I., Fukui, S. and Wingard, L.B. (1982).

(eds.) *Enzyme Engineering* Vol.6 Plenum Press, New York.

Chibata, I, Tosa, T. and Takata, I. (1983).

Continuous production of L-malic acid by immobilized cells. *Trends in Biotechnology*, Vol.I.pp.9-11.

Darbyshire, J. (1981) . Large-scale enzyme extraction and recovery In; *Topics in Enzyme Fermentation & Biotechnology*, pp.147-86. Edited by A.Wisemen, Ellis Horwood, Chichester.

Dixon, M.and Webb, E.C. (1979) .*Enzymes*.Longman London.

Elander, R.P.and Demain, A.L. (1981) . Genetics of microorganisms in relation to industrial requirements.In; *Biotechnology* Vol. 1 *Microbial Fundamentals* 235-277 Verlac Chemie. Basel.

Fish, N.M. and Lilly, M.D. (1984).The interaction between fermentation and protein recovery *Biotechnology* July 623-7.

Fukul, S. and Tanaka, A. (1982) *Immobilized Microbial Cells. Annual Review of Microbiology* 36, 145-72.

Godfrey, T.and Reichelt, J. (1983) *Industrial Enzymology, The Applications of Enzymes in Industry* Macmillan, London.

Klibanoy, A. M. (1983). Immobilizedenzymes and cells as practical catalysts. *Science* 219, 722-7.

Lambert, P.W (1983). Industrial enzyme production and recovery from filamentous fungi. In; *The Filamentous Fungi*, Vol.4, pp. 210-37. Edward Arnold,

London.

Marconi, W. (1980) . Immobilized enzymes in nutritional applications. In: *Enzyme Engineering: Future Directions*, pp.465-81. Edited by L.B.Wingard. Plenum Press, New York.

Mattiasson, B. (1983). *Immobilized Cells and Organelles*, Vols 1, 2. CRC Press, Florida.

Prenosil, J.E. and Pedersen, H. (1983) . Immobilized plant cell reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 5, 323-32.

Priest, F.G. (1984) . *Extracellular Enzymes*. Aspects of Microbiology 9 Van Nostrand Reinhold (UK), Wokingham.

Rastetter, W. H. (1983) . Enzyme engineering: applications and promise. *Trends in Biotechnology* 1, 80-4.

Scott, C.D. (1983) . Fluidised-bed bioreactors using a flocculating strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol formation. *Annals New York Academy Sciences* 413, 448-56.

Shuler, M.L. Sahal, O.P. and Halisby, G.A. (1983). Entrapped plant cell tissue. cultures. *Annals New York Academy Sciences* 413, 373-82.

Thomas, D. and Gellf, .G. (1982). Enzyme technology and molecular biology. *J. Chemical Technology and Biotechnology* 32: 14-17.

Wang, D.I. C., Cooney, C. L. Demain, A. Dunnill, P. Humphrey, A.E. and Lilly, M.D. (1979). Enzyme isolation. In: *Fermentation and Enzyme*

Technology: 238-310. Edited by C. G. Heden, John Wiley & Sons. New York.

WEE, ALL, H.H. and Suzuki, S. (1975) *Immobilized Enzyme Technology*. Plenum Press. New York.

Wimfenny, J. W. T. (1967). Breakage of microorganisms. *Process Biochemistry* 2, 41-4.

Wiseman, A. (1975). *Handbook of Enzyme Biotechnology* Ellis Horwood. Chichester.

Wiseman, A. (1977-9). *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Ellis Horwood, Chichester.

Anderson, J. G. (1983). Immobilized cell and film reactor systems for filamentous fungi. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 4, 145-70. Edward Arnold, London.

Armstrong, K. (1980). Proteinases *Microbial Enzymes and Bioconversions* 5, 49-114.

Atkinson, B. (1974). *Biochemical Reactors*. Pion Press, London.

Aunstrup, K, Andresen, O, Falch, E. A. and Nielson, T.K. (1981). Production of microbial enzymes. *Microbial Technology*, 2nd ed, Vol. 1, pp. 281-311.

Bucke, C. (1983). There is more to sweeteners than sweetness. *Trends in Biotechnology* 3, 67-9.

第5章:

Atkinson, B. and Mavituna, F (1983). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Macmillan, London.

Atkinson, B. and Sainter, P. (1982). Development of downstream processing. *Journal of Chemical Technology*

and *Biotechnology* 32:100—8.

Bywater, R. P. and Marsden, W.V.B. (1983) . Gel chromatography. In : *Chromatography Part A*. pp.257-330. Edited by A.E.Heftmann, Elsevier, Amsterdam.

Cooney, J. M. (1984) .Chromatographic gel media for large scale protein purification. *Biotechnology* January 41-5.

Darbyshire. J (1981) . Large-scale enzyme extraction and recovery. In: *Topics in Enzyme Fermentation and Biotechnology*. pp.147-86. Edited by A.Wiseman, Ellis Horwood. Chichester.

Dunn : H. P. (1983) . Trends in downstream processing of proteins and enzymes. *Process Biochemistry* October.

Fish, N.M. and Lilly, M.D. (1984). The interactions between fermentation and protein recovery. *Biotechnology* July 623-7.

Flannery. R.J. and Steinschneider, A (1983).

Fermentation economics in relation to genetic engineering. *Biotechnology* November 773-6.

Janson, J-C. (1984). Large-scale affinity purification: state of the art and future prospects. *Trend, in Biotechnology* 2.31-8.

Lambert. P. W. (1983) . Industrial enzyme production and recovery from filamentous fungi In: *Fungal Technology*, pp.210-37. Edited by J.E.Smith. D.R.Berry and B. Kristiansen Edward Arnold, London.

Masters. K. (1979) . *Spray Drying Handbook*. George Godwin, London.

Mattiasson. B (1983) . Applications of aqueous two-

phase systems in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 1, 16-20.

MELLING, J. and PHILLIPS, B. W. (1975). Large-scale extraction and purification of enzymes. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, pp. 58-78. Edited by A. Wiseman. Ellis Horwood. Chichester.

Priest, F. G. (1984). *Extracellular Enzymes. Aspects of Microbiology* 9. Van Nostrand Reinhold (UK), Wokingham.

Richey, J. (1983). FPLC: a comprehensive separation technique for biopolymers. *International Laboratory* 13. 52-4, 58-60, 62-6, 68-70, 72-5.

Tutanjian, R. S. (1983). Ultrafiltration processes in biotechnology. *Annals New York Academy of Sciences* 413, 238-53.

Walton, H. F. (1983). Ion-exchange chromatography. In *Chromatography Part A*, pp. 225-255. Edited by A. E. Heftmann. Elsevier, Amsterdam.

Wimpenny, J. W. T. (1967). Break age of micro-organisms. *Process Biochemistry* 2(7): 41-4.



S0013764

388.85(36tr.)

58.17

883

~~014063~~
014063

书 名 失物工程原理

借者姓名	借出日期	还书日期
罗宗礼	92.8.27	
石 强	92.1.20	

分 类 编 号
58.17
883
登记号

~~014063~~
014063

读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意撕折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请给予合作。



ISBN 7-5062-1149-1/Q·4 定价:6.40元